

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/027278 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/02, 5/06, 9/10, C12Q 1/02, A61L 27/38, A61K 45/00, 48/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09732
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 20 日 (20.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-290005 2001 年 9 月 21 日 (21.09.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社トランスサイエンス (TRANS-SCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒105-0003 東京都港区西新橋一丁目 6 番 1 4 号 相馬西新橋ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 中辻 憲夫 (NAKATSUJI, Norio) [JP/JP]; 〒606-0014 京都府京都市左京区岩倉西河原町 2 7 3-7 Kyoto (JP). 多田 高 (TADA, Takashi) [JP/JP]; 〒606-8314 京都府京都市左京区吉田下大路町 4 9-1 0 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 多田 政子 (TADA, Masako) [JP/JP]; 〒606-8314 京都府京都市左京区吉田下大路町 4 9-1 0 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 山本 秀策, 外 (YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目 2 番 2 7 号 クリスタルタワー 1 5 階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,

[続葉有]

(54) Title: TAILOR-MADE MULTIFUNCTIONAL STEM CELLS AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: テーラーメイド多能性幹細胞およびその利用

(57) Abstract: It is intended to provide cells, tissues and organs each capable of serving as a donor for treating diseases without inducing immunorejection, starting with no egg cell. This object is achieved by providing multifunctional stem cells having a desired genome. These cells are obtained by treating with a reprogramming factor, constructing fused cells of MHC-lacking stem cells with somatic cells, and, after the construction of the fused cells of the stem cells with the somatic cells, eliminating the stem cell-origin genome by a genetic engineering technique, for example, treating with a retrovirus.

(57) 要約:

本発明は、免疫的拒絶反応を惹起せず、卵細胞を材料とせずに、疾病を処置するためのドナーとなり得る細胞、組織および臓器を効率的に確立することを課題とする。この課題は、所望のゲノムを有する多能性幹細胞を提供することによって解決された。この細胞は、再プログラム化因子を作用させること、MHC欠損幹細胞-体細胞の融合細胞を作製すること、幹細胞-体細胞の融合細胞を作製した後、レトロウイルスなどにより遺伝子操作をすることによって、幹細胞由来のゲノムを除去することによって達成された。



WO 03/027278 A1



TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## テラーメイド多能性幹細胞およびその利用

5

## 技術分野

本発明は、個人に対応した、テラーメイド多能性幹細胞に関する。より特定すると、ES細胞を直接使用しない、多能性幹細胞およびその利用に関する。詳細には、本発明は、胚性幹細胞（本明細書においてES細胞ともいう）由来の移植抗原の一部または全部を欠失させた多能性幹細胞の製造方法、ならびにその融合細胞から体細胞由来の主要組織適合抗原のみを発現する細胞、組織または臓器を分化させることを含む、細胞、組織または臓器の製造方法に関する。また、本発明は該方法により製造される体細胞由来の主要組織適合抗原のみを発現する多能性幹細胞、ならびに細胞、組織および臓器に関する。

15

## 背景技術

ES細胞は、初期の胚から誘導される迅速に増殖する未分化の全能性細胞であり、胚性腫瘍細胞と類似の性質を示す。ES細胞は最初、マウス胚盤胞の内  
20 部細胞塊（Inner cell mass；ICM）をマウス繊維芽細胞のフィーダー細胞層上で培養することにより確立された。ES細胞は、フィーダー細胞層および／または白血病阻害因子（LIF）の存在下のその未分化の状態を維持するような条件下では無限の寿命を有する[R. Williams et al., Nature 336：684－687（1988）]。また、高い  
25 インビトロ分化能を有し、集合塊として培養するだけで多種類の細胞に分化させることができることが知られている。ES細胞は、着床前の段階の胚より確

立され、外胚葉、中胚葉および内胚葉の3胚葉由来の種々の細胞型へ分化する多分化能を有する細胞である [M. J. Evans and M. H. Kaufman, Nature 292:154-156 (1981); G. R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:7634-7638 (1981)]. 即ち、ES細胞は成体のあらゆる成熟細胞へと分化する能力を有し、例えば、正常な初期の胚中に導入しキメラ胚を形成させることによりキメラ動物の体細胞および生殖細胞の両方へ分化させることができる [R. L. Brinster, J. Exp. Med. 140:1949-1956 (1974); A. Bradley et al., Nature 309:255-256 (1984)]. 精巣および卵巣等の生殖細胞にES細胞由来の細胞が導入されたキメラ動物を親として交配することにより、ES細胞由来の細胞のみで構成される子孫を得ることができる。これは即ち、遺伝学的に十分制御された人為的素質を有する動物を獲得できるということである。このような動物により、インビトロに限らず個体レベルにおいても発生および分化のメカニズムについての研究が可能となる。ES細胞は、胚性腫瘍細胞とは異なり、その多くが正常二倍体の核型を保持した正常細胞であり、キメラ形成率が高く、生殖系列の細胞へ分化する確立も高く [A. Bradley et al., Nature 309:255-256 (1986)]、発生学分野以外でもES細胞の利用範囲は広がりつつある。

20

ES細胞はまた、細胞研究および細胞分化を決定する遺伝子研究にとって重要な役割を果たしている。例えば、配列の知られた遺伝子の機能解析のため、マウスES細胞は遺伝的改変を導入し、遺伝子の破壊されたマウス株の産生に用いられてきた。未分化ES細胞の使用は、ヒトゲノム解読後の機能解析作業においてきわめて効率がよく有効である。また、ES細胞はインビトロにおいて、広い範囲にわたる種々の細胞型へ分化することができるため、胚発生の際

25

の細胞分化機構を研究するために使用されてきた。ES細胞を成長因子の添加、または胚様体を形成することにより造血細胞、心筋、および、幾つかの型のニューロン等の臨床的に有用な細胞へと分化するよう促すことが可能となってきた [M. Willet et al., Development 111:259-267 (1991); W. Miller-Hance et al., J. Biol. Chem. 268:25244-25252 (1993); V. A. Maltsev et al., Mech. Dev. 44:41-50 (1993); G. Bain et al., Dev. Biol. 168:342-357 (1995)]。有用な細胞へと分化させるマウスES細胞についての誘導の試みは、造血細胞、心筋、特異的ニューロン、および、血管の製造について成功している [T. Nakano et al., Science 265:1098-1101 (1994); R. Pacacios et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7530-7534 (1995); V. A. Maltsev et al., Mech. Dev. 44:41-50 (1993); S. H. Lee et al., Nat. Biotechnol. 18:675-679 (1999); H. Kawasaki et al., Neuron 28:31-40 (2000); S.-I. Nishikawa, Development 125:1747-1757 (1998); M. Hirashima et al., Blood 93:1253-1263 (1999)]。

現在、ハムスター [Doetshman T. et al., Dev. Biol. 127:224-227 (1988)]、ブタ [Evans M. J. et al., Theriogenology 33:125128 (1990); Piedrahita J.A. et al., Theriogenology 34:879-891 (1990); Notarianni E. et al.,

J. Reprod. Fert. 40:51-56 (1990); Talbot N. C. et al., Cell. Dev. Biol. 29A:546-554 (1993)], ヒツジ [Notarianni E. et al., J. Reprod. Fert. Suppl. 43:255-260 (1991)], ウシ [Evans M. J. et al., Theriogenology 33:125-128 (1990); Saito S. et al., Roux. Arch. Dev. Biol. 201:134-141 (1992)], ミンク [Sukoyan M. A. et al., Mol. Reprod. Dev. 33:418-431 (1993)], ウサギ [特表2000-508919号] ならびに、  
10 アカゲザルおよびマーモセット等の霊長類 [Thomson J. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844-7848 (1995); Thomson J. A. et al., Biol. Reprod. 55:254-259 (1996)] 等のES細胞が確立されている。ヒトES細胞も確立されており、それらはマウスES細胞と類似した分化能を示した [J. A. Thomson et al., Science 282:1145-1147 (1998); J. A. Thomson et al., Dev. Biol. 38:133-165 (1998); B. E. Reubinoff et al., Nat. Biotechnol. 18:399-404 (2000)]。  
15 主に、マウスES細胞を用いて得られた分化誘導調節について蓄積された膨大な知識を適用することにより、ヒトES細胞が心筋梗塞、パーキンソン病、糖尿病および白血病を含む多数の疾病における移植治療用の種々の細胞・組織の無限の材料となり、移植治療におけるドナー不足問題が解消されることが期待されている。2000年の6月23日には、豪・米・独による3つの研究チームが、国際幹細胞生物シンポジウムにおいて、ヒトES細胞から神経細胞および筋肉細胞などを初めて作り出すことに成功したことを報告した。また、最近、  
25 ヒトES細胞からの造血細胞を分化させる方法についても報告されている。し

かしながら、移植治療においてES細胞を用いる場合にも、今日の臓器移植と同様に免疫的拒絶反応は生じるという問題は残されている。

- 5 生きた組織の移植は種々の理由で行なわれている。臓器移植により欠損した機能を補い、例えば、腎臓のような重要臓器の致命的疾患を救うこともできる。同一個体で他の部位に移植する場合、これは自家移植と呼ばれ、自家移植片は拒絶されない。一卵性双生児間および近交系動物間での移植を同系移植といい、この場合も、移植片は宿主にいつまでも生着する。同種間の移植を同種（異系）移植といい、拒絶を防ぐ特別な処置を行なわない場合には移植片は拒絶される。
- 10 また、異なる種属間の移植を異種移植といい、移植片は宿主により速やかに破壊される。

- 移植片拒絶を招く因子は、移植抗原あるいは組織適合性抗原と呼ばれる。赤血球を除くすべての体細胞は移植抗原を有している。赤血球は独自の血液型（A
- 15 B O）抗原を持つ。主なヒト移植抗原は、主要組織適合抗原またはHLA（ヒト白血球グループA）と呼ばれ、第6染色体の遺伝子によって支配される。HLA抗原は、拒絶反応の標的であるクラスI抗原、および拒絶反応の開始の役を果たすクラスII抗原の2群に分類される。クラスI抗原は全ての組織にみられるが、クラスII抗原はそうではなく、マクロファージ様の細胞である指
- 20 状の突起を有する樹状細胞に多数発現している。拒絶反応が開始しないよう、このような細胞を臓器移植組織から除去する試みについては実験的な成功例はあるが、実用には向かず、現在のところ臨床的には応用されていない。

- 移植後に発症する拒絶反応は、超急性拒絶反応、促進型急性拒絶反応、急性
- 25 拒絶反応、慢性拒絶反応に分類することができる。超急性拒絶反応はレシピエントの血清中にドナーのHLA抗原に反応する既存抗体が存在しているときに

起こる。血管結合が終了し、臓器への血流を再開した後、数時間以内に起こる激しい拒絶反応で移植臓器は直ちに廃絶される。現在、治療法はなく、移植前にリンパ球交差試験を行い、レシピエント血清中にドナーリンパ球に反応する抗体を持つことが認められた場合、その移植を断念することで予防することでしか防ぐことができない。促進型急性拒絶反応は、ドナーのHLA抗原に反応性のTリンパ球が、移植前にレシピエントの体の中に存在するときに発現する。移植後7日以内に発症することが多く、超急性拒絶反応同様、激しい拒絶反応であるが、近年の治療薬の進歩により治癒させることも可能となってきた。急性拒絶反応は移植された臓器のドナーHLA抗原によって、主にTリンパ球

5 による細胞性の免疫反応が惹起された結果として起こるものである。移植後に最もよくみられる拒絶反応で、通常、移植後2週目から1か月位までに認められる。慢性拒絶反応は、臨床的には治療に抗して徐々に進行する臓器機能の低下を特徴とし、多くは移植後6か月から1年を経過してから発症する。基本的には、ドナーHLA抗原の侵入により活性化されたレシピエントの免疫反応が

10 引き起こす移植臓器の組織障害と、それに対応した臓器組織の反応により、長期にわたって進行していく組織変性と考えられている。レシピエントと同じMHC分子構造の臓器を移植しない限り、必ず拒絶反応が起こる。現在のところ、

15 どのように拒絶反応をコントロールするかは大きな課題である。

20 上述のような拒絶反応を起こさないようにする免疫抑制法として、大きく分けて、免疫抑制剤によるもの、外科的手術、放射線照射等が挙げられる。まず、免疫抑制剤として主なものとして副腎皮質ステロイド薬、シクロスポリン、FK506等がある。副腎皮質ステロイド薬は循環性T細胞の数を減少させ、リンパ球の核酸代謝、サイトカイン産生を阻害してその機能を抑え、マクロファ

25 ージの遊走および代謝を抑制して免疫反応を抑える。一方、シクロスポリンおよびFK506の作用は類似しており、ヘルパーT細胞の表面にある受容体と



結合して細胞内に入り込み、DNAに直接働いてインターロイキン2の生成を阻害する。最終的には、キラーT細胞が機能できなくなり免疫抑制作用が起こる。これらの免疫抑制剤の使用においては副作用が問題となる。ステロイドは特に副作用が多く、また、シクロスポリンは肝臓・腎臓に対する毒性がある。

- 5 また、FK506は腎臓に対する毒性を有する。次に外科的手術としては、例えば、リンパ節摘出、脾臓摘出、胸腺摘除が挙げられるが、これらについてはその効果が十分に証明されてはいない。外科的手術の中でも胸管ろうとは、循環しているリンパ球を体外に導くものであり効果も確認されているが、大量の血清タンパク質および脂肪の流出を引き起こし、栄養障害が起こりやすくなる
- 10 という欠点がある。放射線照射には全身照射と移植片照射があるが、効果が不確実な面もあり、レシピエントに対する負担が大きいため、前述の免疫抑制剤との併用により利用されている。上述のいずれの方法も拒絶反応の防止に理想的ではないことは明らかである。

- 15 現在、除核した卵細胞への体細胞核の導入により、体細胞核が全能性に再プログラム化されることが哺乳動物でも示され、クローンヒツジ、クローンウシ、クローンマウス、およびクローンブタ等が作成されている[Wilmurt I. et al., Nature 385:810-813 (1997); Kato Y. et al., Science 282:2095-2098 (1998);
- 20 Wakayama T. et al., Nature 394:369-374 (1998); Onishi A. et al., Science 289:1188-1190 (2000); Polejaeva I. A. et al., Nature 407:86-90 (2000)]。この技術を利用し、移植を受ける宿主由来の体細胞の核を卵細胞を用いて再プログラム化し、全能性の細胞
- 25 胞を作製することにより免疫的拒絶反応を惹起しない移植片を作製することができると考えられる。また、このような細胞培養の方法によれば、ドナー不足

をも解消することができると思われる。

しかしながら、ヒトの治療用クローニングは、生物医学的倫理問題という社会問題に遭遇している (Weissman, I. L., N Engl J Med 346, 1576-1579. (2002))。上述の方法では卵細胞を用いる必要があることが倫理的な観点で問題となっている。また、ヒトにおいては、ES細胞は初期胚の未分化な細胞に由来するということ、および成体の初期胚は存在しないという現実を考慮すると、初期胚より後の状態、特に成体である宿主からES細胞を樹立できないという原理的な問題がある。従って、個人に対応したES細胞のような多能性幹細胞を得るということは今までに達成されておらず、当該分野において解決されることが渴望されている課題である。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、個人対応型の多能性幹細胞を簡便に入手することを課題とする。より特定すると、本発明は免疫的拒絶反応を惹起せず、ES細胞などの幹細胞を新たにその個人から取り出し樹立することをせずに、しかも卵細胞を材料とせずに、疾病を処置するためのドナーとなり得る細胞、組織および臓器を効率的に確立することを課題とする。

## 20 発明の要旨

本発明者らは、種々の方法を用いて、治療処置の対象となる個体などのような所望の個体由来のゲノムを有し、免疫拒絶反応が低減しており、かつ、多能性を有する幹細胞を予想外に作製することに成功したことによって、上述の課題の解決に至った。

まず、本発明者らは、幹細胞（例えば、E S細胞）と体細胞とを融合した4倍体細胞を作製し、該細胞がインビボおよびインビトロで増殖させることができ、また、体細胞核が再プログラム化されており、多分化能を有することを明らかにした。本発明では、このような4倍体細胞において、宿主中で免疫的拒絶反応を惹起する幹細胞（例えば、E S細胞）由来因子、即ち幹細胞由来の移植抗原の一部または全部を発現しない幹細胞（例えば、E S細胞）を個人対応型多能性幹細胞作製の際に利用する。

上記幹細胞（例えば、E S細胞）由来の移植抗原の一部または全部を発現しない幹細胞を個人対応型多能性幹細胞は、例えば、移植抗原の一部または全部（特に主要組織適合性抗原）を欠損させた幹細胞（例えば、E S細胞）を体細胞と融合させることによって達成される。この場合、幹細胞由来の移植抗原は、個人対応型多能性幹細胞から低減または除去されており、移植拒絶反応は顕著に減少させることができた。

15

上記幹細胞（例えば、E S細胞）由来の移植抗原の一部または全部を発現しないE S細胞を個人対応型多能性幹細胞はまた、例えば、幹細胞（例えば、E S細胞）と体細胞とを融合させた後、幹細胞（例えば、E S細胞）由来のゲノムを遺伝子操作によって除去することによって達成される。この場合、幹細胞由来のゲノムが融合細胞から完全に除去され得、拒絶反応の全くない「完全」個人対応型多能性幹細胞を得ることができた。

20

さらに、幹細胞（例えば、E S細胞）由来の再プログラム化因子を予想外に同定したことにより、その再プログラム化因子を用いて、所望のゲノムを有する細胞（例えば、体細胞）に多能性を付与することによって、多能性幹細胞を作製することに成功した。この場合もまた、所望のゲノム以外の遺伝子を有し

25

ない、拒絶反応の全くない「完全」個人対応型多能性幹細胞を得ることができた。

5 この融合細胞、または再プログラム化された体細胞などの、所望のゲノムを有する多能性幹細胞から分化された細胞、組織および臓器はレシピエントに導入された場合に、幹細胞（例えば、ES細胞）由来の移植抗原の全てを有する細胞由来のものと比べレシピエントにおいて受ける拒絶反応が減少または完全に除去される。即ち、本発明の多能性幹細胞は疾病を処置するためのドナーとなる細胞、組織および臓器を確立するための理想的な材料となり得る。これら  
10 の細胞、組織および臓器は、テーラーメイド型医療において多大な適用を有し、その産業上の有用性は高い。

本発明は具体的には、以下を提供する。

- 15 1. 所望のゲノムを有する、単離された多能性幹細胞。  
2. 非ES細胞である、項目1に記載の多能性幹細胞。  
3. 移植抗原の少なくとも一部が欠失された、項目1に記載の多能性幹細胞。  
4. 移植抗原の全部が欠失された、項目1に記載の多能性幹細胞。  
5. 前記移植抗原は、少なくとも主要組織適合抗原を含む、項目1に記載の多  
20 能性幹細胞。  
6. 前記主要組織適合抗原は、クラスI抗原を含む、項目3に記載の多能性幹細胞。  
7. 前記ゲノムは再プログラム化されている、項目1に記載の多能性幹細胞。  
8. 細胞を再プログラム化することによって作製された、項目1に記載の多能  
25 性幹細胞。  
9. 前記細胞は、体細胞である、項目8に記載の多能性幹細胞。

10. 幹細胞と体細胞との融合によって作製された、項目1に記載の多能性幹細胞。
11. 前記幹細胞は、ES細胞である、項目10に記載の多能性幹細胞。
12. 前記幹細胞は、組織幹細胞である、項目10に記載の多能性幹細胞。
- 5 13. 所望の個体由来のゲノムを有し、かつ、該所望の個体のES細胞でも卵細胞でもない、項目1に記載の多能性幹細胞。
14. 所望の個体の体細胞由来の染色体を有する、項目1に記載の多能性幹細胞。
15. 胚に直接由来しない、項目1に記載の多能性幹細胞。
- 10 16. 体細胞由来の、項目1に記載の多能性幹細胞。
17. 所望の個体以外の移植抗原が低減された、項目1に記載の多能性幹細胞。
18. 所望の個体の卵細胞以外の細胞由来の、項目1に記載の多能性幹細胞。
19. 前記所望のゲノムは、初期胚以外の状態の個体のものである、項目1に記載の多能性幹細胞。
- 15 20. 移植抗原の一部または全部が欠失されたES細胞と、体細胞との未分化な体細胞融合細胞である、項目1に記載の多能性幹細胞。
21. 移植抗原の全部が欠失されたES細胞と、体細胞との未分化な体細胞融合細胞である、項目1に記載の多能性幹細胞。
22. 前記移植抗原は、主要組織適合抗原である、項目20に記載の多能性幹細胞。
- 20 23. 前記主要組織適合抗原はクラスI抗原である、項目22に記載の多能性幹細胞。
24. 前記体細胞は移植個体由来のリンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞である、項目20に記載の多能性幹細胞。
- 25 25. 前記ES細胞および前記体細胞の少なくとも1つはヒト由来の細胞である、項目20に記載の多能性幹細胞。

26. 前記体細胞はヒト由来の細胞である、項目20に記載の多能性幹細胞。
27. 前記体細胞および前記幹細胞の少なくとも一方は、遺伝子改変されたものである、請求20に記載の多能性幹細胞。
28. 所望のゲノムを有する多能性幹細胞を生産する方法であって、
- 5      1) 該幹細胞における移植抗原の一部または全部を欠失させる工程；および
- 2) 幹細胞と該所望のゲノムを有する体細胞とを融合させる工程、
- を包含する、方法。
29. 前記幹細胞は、ES細胞である、項目28に記載の方法。
30. 前記ES細胞は、樹立されたES細胞である、項目28に記載の方法。
- 10    31. 前記移植抗原は、主要組織適合抗原である、項目28に記載の方法。
32. 前記主要組織適合抗原は、クラスI抗原である、項目31に記載の方法。
33. 前記体細胞は、移植個体由来のリンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞である、項目28に記載の方法。
34. 前記幹細胞および前記体細胞の少なくとも1つはヒト由来の細胞である、
- 15    項目28に記載の方法。
35. 前記移植抗原を全部欠失させる工程を包含する、項目28に記載の方法。
36. 所望のゲノムを有する多能性幹細胞を生産する方法であって、
- 1) 該所望のゲノムを有する細胞を提供する工程；および
- 2) 該細胞を再プログラム化因子を含む組成物に曝す工程、
- 20    を包含する、方法。
37. 前記細胞は、体細胞である、項目36に記載の方法。
38. 前記再プログラム化因子は、ヒストンH3    L y s 4メチル化に直接的または間接的に関連する細胞周期調節因子、DNAヘリカーゼ、ヒストンアセチル化因子および転写因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子によって調製される、項目36に記載の方法。
- 25    39. 所望のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した、細胞、組織または臓

器。

40. 前記細胞は、筋肉細胞、軟骨細胞、上皮細胞、または神経細胞である、項目39に記載の細胞。

5 41. 前記組織は、筋肉、軟骨、上皮または神経のものである、項目39に記載の組織。

42. 前記臓器は、脳、脊髄、心臓、肝臓、腎臓、胃、腸および脾臓からなる群より選択される、項目39に記載の臓器。

43. 前記細胞、組織または臓器は移植に用いられるものである、項目39に記載の細胞、組織または臓器。

10 44. 前記所望のゲノムは、移植されるべき宿主と実質的に同一である、項目39に記載の細胞、組織または臓器。

45. 所望のゲノムを有する、多能性幹細胞から分化された、細胞、組織または臓器を含む、医薬。

15 46. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防するための医薬であって、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する、多能性幹細胞を含む、医薬。

47. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、

該被検体と実質的に同一のゲノムを有する、多能性幹細胞を調製する工程；

20 該多能性幹細胞から、該細胞、組織または臓器を分化させる工程；および  
該細胞、組織または臓器を該被検体へと投与する工程、

を包含する、方法。

48. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、

25 該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞を該被検体に投与する工程、

を包含する、方法。

49. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、

- 5 該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した、細胞、組織または臓器を含む、医薬を該被検体に投与する工程、  
を包含する、方法。

50. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防するための医薬を製造するための多能性幹細胞の使用であって、該医薬は、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞を含む、多能性幹細胞の使用。
- 10

51. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防するための医薬を製造するための多能性幹細胞の使用であって、該医薬は、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した細胞、組織または臓器を含む、多能性幹細胞の使用。

- 15 52. 所望のゲノムを有する、多能性幹細胞を含む、医薬を製造するための、多能性幹細胞の使用。

53. 所望のゲノムを有する、多能性幹細胞から分化された、細胞、組織または臓器を含む、医薬を製造するための、多能性幹細胞の使用。

54. ヒストンH3-Lys4のメチル化酵素またはメチル化に関わる因子、細胞周期因子、DNAヘリカーゼ、ヒストンアセチル化因子および転写因子からなる群より選択される、再プログラム化因子。
- 20

55. 前記因子は、転写因子Sp1もしくはSp3またはそのコファクターである、項目54に記載の再プログラム化因子。

- 25 図面の簡単な説明

図1は、ES融合細胞中の胸腺細胞由来Tcr $\beta$ 、Tcr $\delta$ 、Tcr $\gamma$ およ



び I g H 遺伝子の DNA 再配列を示す P C R 分析の結果を示す写真である。

- (a) ~ (d) の写真は各々、次の領域に対して特異的なプライマーセットを用いた P C R 分析の結果である：(a) T c r  $\beta$  の D - J 領域、(b) I g H の D - J 領域、(c) T c r  $\delta$  の V - J 領域、(d) T c r  $\gamma$  の V - J 領域。用いた DNA 試料は次の通りである：T ; (R o s a 2 6  $\times$  O c t 4 - G F P) F 1 マウスの胸腺細胞由来、E S ; E S 細胞由来、M ;  $\lambda$  / H i n d I I I D N A および 1 0 0 b p l a d d e r DNA のマーカー混合物、1 ~ 7 ; E S ハイブリッドクローン由来。

- 図 2 は、E S 融合細胞中の胸腺細胞由来 X 染色体の再活性化を示す写真である。(a) E S 融合細胞中の X 染色体複製のタイミングの R 分染分析の結果を示す。E S 融合細胞では、3 本の X 染色体（雌胸腺細胞より 2 本の X 染色体、そして雄 E S 細胞より 1 本の X 染色体）が赤、および緑に検出され、活性であることが示された。(a) において、同時に複製する 3 本の X 染色体が、(c) で拡大して示される（矢印）。雌体細胞中の X 染色体（(b) 中矢印で示す）、および Y 染色体（(a) 中）は、均一に赤色に染色され、不活性であることが示された。(d) X i s t RNA は、雄 E S 細胞の活性 X 染色体上に斑点状の赤いシグナルとして検出されるのに対して、大きな赤いシグナルとして雌胸腺細胞の不活性 X 染色体は全体を覆う。調べた 2 つの E S ハイブリッド細胞株（E S X T 1 および E S X T 2）中で、各核について 3 つの斑点状の赤いシグナルが検出された。

- 図 3 は、E S 融合細胞中の再活性化を示す顕微鏡写真である。E S 融合細胞の作製に用いた (R o s a 2 6  $\times$  O c t 4 - G F P) F 1 マウスの胸腺 (a, b)、および卵巣 (c, d) の G F P 蛍光像、および明視野像である。(e) 融合 2 日後のコロニーの明視野像であり、矢印は (f) により示された G F P -

陽性コロニーを指し示す。(f)融合2日後のGFP蛍光像である。小さなGFP陽性のコロニーが、非発現ES細胞コロニーの横に出現している。陽性コロニーの写真を上部に拡大して示す。(g)(h)についての明視野像である。(h)G418選択後のコロニーより拡張したGFP陽性細胞についての写真である。

5

図4は、インビボにおけるES融合細胞の発達能を示す図および写真である。

(a)ES融合細胞、およびキメラ胚の作製方法を模式的に示す図である。(b)ES融合細胞のE7.5キメラ胚の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性染色の結果を示す写真である。融合細胞由来の細胞は青色に示される。(c)E7.5キメラ胚を縦軸方向に切断した切片について組織学的分析を行った結果を示す写真である。(d,e)より高倍率でのキメラ胚切片の写真である。Ect;外胚葉、Mes;中胚葉、End;内胚葉。

10

図5は、ESハイブリッドおよびES×EG融合細胞中のH19遺伝子、およびIgf2r遺伝子のメチル化についての分析に関連した図、ならびに分析結果の写真である。(a)はH19遺伝子、(b)および(c)はIgf2r遺伝子についての分析結果を示す。矢印はメチル化DNA断片を指し、○は未メチル化DNA断片を表す。実験方法のまとめを(c)に図示する。各レーンの表示は次の通りである：T;胸腺細胞、ES/T;ESおよび胸腺細胞DNAの1:1混合物、ES/EG;ESおよびEG DNAの1:1混合物、ESXT;ES細胞およびRosa26胸腺細胞のESハイブリッドクローン。

20

図6は、テラトーマの形成、およびキメラ胚の作製についての模式図、ならびに、キメラ胚およびテラトーマの顕微鏡写真である。

25

図7は、ES細胞と成体リンパ球との間の融合細胞の特徴および多能性を示す図である。融合細胞由来のテラトーマのパラフィン切片における以下のものが示される：(A) domesticus (dom) ES細胞と molossinus (mol) 胸腺細胞との間の亜種間の融合細胞の産生および分化の実験スキーム；(B) 四倍体融合細胞クローン HxJ-18 の代表的な有糸分裂中期像；(C) Tcr $\beta$  および IgH 遺伝子の D-J DNA 再配列のゲノム PCR 分析；および (D) 以下の外胚葉、中胚葉および内胚葉の組織特異的マーカータンパク質の発現：クラス III  $\beta$  チューブリン (TuJ)、ニューロフィラメント M (NF-M)、アルブミン (Alb) およびデスミン (Des)。切片は、

10 ヘマトキシリンおよびエオシン (HE) で対比染色した。

図8は、融合細胞の外胚葉、中胚葉および内胚葉への誘導物における体細胞ゲノム特異的な RT-PCR 産物を示す。(A) 未分化および分化した HxH-17 および HxJ-18 の融合クローンにおいて以下を用いて行った：外胚葉性 Pitx3、中胚葉性 MyoD、Myf-5 および Desmin、ならびに

15 内胚葉性 Albumin および  $\alpha$ -Fetoprotein。e18.5 胚はコントロールとして用いた。(B) 再プログラム化された体細胞ゲノムからの外胚葉性 Pitx3 の転写物：domesticus (dom) ES ゲノムにおける mRNA のグアニン残基は、molossinus (mol) 体細胞ゲノムにおけるアデニン残基に置換されていた。(C) 再プログラム化された体細胞ゲノムからの内胚葉性 Albumin 転写物：domesticus 型の RT-PCR 産物は、単一の NcoI 消化部位を有するが、他方、molossinus 型の産物は、2つの NcoI 部位を有する。(D) 再プログラム化された体細胞ゲノムからの中胚葉性 MyoD 転写物：domesticus 型 RT-

20 PCR 産物は、BssHI 消化に感受性であるが、他方、molossinus 型の産物は、BssHI 消化に感受性ではない。

図9は、PA6フィーダー細胞におけるインビトロでの融合細胞の神経分化誘導を示す。(A)宿主molossinus MP4 ES細胞から分化したコントロールとしての神経細胞。TuJ (赤)；有糸分裂後のニューロン特異的  
5 マーカートンパク質およびEcad (緑色)；幹細胞特異的マーカー。(B) MxR-3融合細胞から分化した神経細胞。ほとんどのコロニーは、ドーパミン産生ニューロンに特異的なTH抗体 (赤) および神経細胞に特異的なマーカーであるNF-M (緑色) を用いて陽性に免疫反応した。(C) TH陽性ニューロンへの分化誘導は有効でありかつ再現性があった。(D) 誘導後11日で融合細胞  
10 からインビトロで分化した神経細胞における、神経細胞特異的遺伝子の発現：ネスティン (神経上皮幹細胞特異的マーカー) およびNF-M (有糸分裂後のニューロン特異的マーカー)。ドーパミン産生ニューロン特異的マーカーである*Nurr1*, *TH*および*Pitx3*の発現は、神経分化誘導後の融合細胞誘導物中において転写された。コントロールのPA6にはシグナルはなかった。  
15 (E) 再プログラム化された体細胞ゲノムからの*Pitx3* (THの転写活性化因子) の発現。*domesticus* (dom) ゲノムにおけるグアニン残基は、*molossinus* (mol) ゲノムにおいてアデニンに変換する。

図10は、マウス脳における融合細胞由来のTH陽性ニューロンの移植片を示す。(A) 図3B、C、DおよびEにおいて特徴づけられたMxR-3融合細胞由来の神経細胞の、マウス脳の線条体への移植。(B) マウス脳におけるTH  
20 を発現する融合細胞由来のニューロン。*lacZ/neo*レポーター遺伝子を有するMxR-3融合細胞由来の神経細胞は、*LacZ*抗体で陽性に検出された (緑色)。*LacZ*抗体およびTH抗体での二重染色によって、融合細胞由来のニューロンがTH (赤) を発現することが示された。重ね図において、*lacZ*  
25 およびTHの二重陽性細胞は、黄色の細胞として可視化された。(C) (B)

における（C）領域における高解像度図である。L a c Z 陽性の融合細胞誘導体（緑）は、注射部位における T H（赤）を発現する。重ね図において、L a c Z および T H の二重陽性細胞は、黄色の細胞として可視化された。

5 図 1 1 は、再プログラム化の模式図を示す。

図 1 2 は、M H C 欠損 E S 細胞－体細胞融合細胞の作製の模式図を示す。

図 1 3 は、ゲノム欠損 E S 細胞－体細胞融合細胞の作製の模式図を示す。

10

図 1 4 は、図 1 3 の模式図において使用される I n s u l a t o r－P o l y m e r a s e I I p r o m o t e r－G F P－L o x P－I n s u l a t o r の構造を示す。

15

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、独語の場合の「e i n」、「d e r」、「d a s」、「d i e」などおよびその格変化形、仏語の場合の「u n」、「u n e」、「l e」、「l a」など、スペイン語における「u n」、「u n a」、「e l」、「l a」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など）は、特に言及しない限り、その複数形概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

25

（用語の説明）

以下に本明細書において使用される用語を説明する。

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を  
5 隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞）であってもよい。

- 10 本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能（すなわち多能性）（「*pluripotency*」）を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、ES細胞または組織幹細胞（組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう）であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞（たとえば、本明細書において記載される融合細胞、  
15 再プログラム化された細胞など）もまた、幹細胞であり得る。ES細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。ES細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒトES細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、ES細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核／細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞  
20 は好ましくはES細胞であり得るが、状況に応じて組織幹細胞も使用され得る。  
25

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵（共通）幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、  
5 間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用さ  
10 れる体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類  
15 され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような胚葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞が使用  
20 され得る。

本明細書において「単離された」とは、通常環境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないをいう。従って、単離された細胞とは、天然環境において付随する他の物質（たと  
25 えば、他の細胞、タンパク質、核酸など）を実質的に含まない細胞をいう。核酸またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換え

DNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリペプチドを指す。単離された核酸は、好ましくは、該核酸が由来する生物において天然に該核酸に隣接している（f l a n k i n g）配列（即ち、該核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質（例えば、多分化能）を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。本発明では、樹立された幹細胞を使用することは、宿主から新たに幹細胞を採取するという工程を回避することができるので好ましい。

本明細書において、「非胚性」とは、初期胚に直接由来しないことをいう。従って、初期胚以外の身体部分に由来する細胞がこれに該当するが、ES細胞に改変（例えば、遺伝的改変、融合など）を加えて得られる細胞もまた、非胚性細胞の範囲内にある。

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、腭実質細胞、腭管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。従って、本発明の1つの実施形態において、ある分化細胞を本発明の再プログラム化因子で処理することによって、多能性を獲得することができる場合、そのような分化細胞もまた本発明における



体細胞としてまたはその代わりに使用され得る。

5 本明細書において、「分化」または「細胞分化」とは、1個の細胞の分裂によって由来した娘細胞集団の中で形態的および／または機能的に質的な差をもった二つ以上のタイプの細胞が生じてくる現象をいう。従って、元来特別な特徴を検出できない細胞に由来する細胞集団（細胞系譜）が、特定のタンパク質の産生などはっきりした特徴を示すに至る過程も分化に包含される。現在では細胞分化を、ゲノム中の特定の遺伝子群が発現した状態と考えることが一般的であり、このような遺伝子発現状態をもたらす細胞内あるいは細胞外の因子または条件を探索することにより細胞分化を同定することができる。細胞分化の結果は原則として安定であって、特に動物細胞では、別のタイプの細胞に分化することは例外的にしか起こらない。従って、本発明におけるような後天的に生じた多能性細胞は非常に価値が高い。

15 本明細書において「多能性」または「多分化能」とは、互換可能に用いられ、細胞の性質をいい、1以上、好ましくは2以上の種々の組織または臓器に分化し得る能力をいう。従って、「多能性」および「多分化能」は、本明細書においては特に言及しない限り「未分化」と互換可能に用いられる。通常、細胞の多能性は発生が進むにつれて制限され、成体では一つの組織または器官の構成細胞が別のものの細胞に変化することは少ない。従って多能性は通常失われている。とくに上皮性の細胞は他の上皮性細胞に変化しにくい。これが起きる場合通常病的な状態であり、化生（metaplasia）と呼ばれる。しかし間葉系細胞では比較的単純な刺激で他の間葉性細胞にかわり化生を起こしやすいので多能性の程度は高い。ES細胞は、多能性を有する。組織幹細胞は、多能性を有する。本明細書において、多能性のうち、受精卵のように生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力は全能性といい、多能性は全能性の概念を

包含し得る。ある細胞が多能性を有するかどうかは、たとえば、体外培養系における、胚様体 (Embryoid Body) の形成、分化誘導条件下での培養等が挙げられるがそれらに限定されない。また、生体を用いた多能性の有無についてのアッセイ法としては、免疫不全マウスへの移植による奇形種 (テラトーマ) の形成、胚盤胞への注入によるキメラ胚の形成、生体組織への移植、腹水への注入による増殖等が挙げられるがそれらに限定されない。

本発明で用いられる細胞は、どの生物由来の細胞 (たとえば、任意の種類の多細胞生物 (例えば、動物 (たとえば、脊椎動物、無脊椎動物)、植物 (たとえば、単子葉植物、双子葉植物など) など)) でもよい。好ましくは、脊椎動物 (たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など) 由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物 (例えば、単孔類、有袋類、貧齒類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など) 由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類 (たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト) 由来の細胞が用いられる。最も好ましくはヒト由来の細胞が用いられる。

本発明が対象とする臓器はどのような臓器でもよく、また本発明が対象とする組織または細胞は、生物のどの臓器または器官に由来するものでもよい。本明細書において「臓器」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物 (例えば、動物、植物) では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする臓器は、皮膚、

血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明の多能性細胞から分化した細胞としては、表皮細胞、脾実質細胞、脾管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞

5      などが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において「組織」(t i s s u e)とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および／または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、

10    同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および／または形態を有するのであれば、組織と呼ばれ得る。従って、本発明の幹細胞を用いて組織を再生する場合、2以上の異なる起源を有する細胞集団が一つの組織を構成し得る。通常、組織は、臓器の一部を構成する。動物の組織は、形態的、機能的または発生的根拠に基づき、上皮組織、結合組織、筋肉組織、

15    神経組織などに区別される。植物では、構成細胞の発達段階によって分裂組織と永久組織とに大別され、また構成細胞の種類によって単一組織と複合組織とに分けるなど、いろいろな分類が行われている。

本明細書において、「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、

20    互換的に用いられ、一連のアミノ酸からなる高分子をいう。

本明細書において、「アミノ酸」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような

25    誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然の

アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、  
5 およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体である。用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラフルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体  
10 またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および／または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式  
15 で機能する化合物をいう。

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Maniatis, T. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989).  
20 *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Cur*

rent Protocols in Molecular Biology,  
Greene Pub. Associates and Wiley-Inte  
rscience; Sambrook, J. et al. (1989). Mol  
ecular Cloning: A Laboratory Manual,  
5 Cold Spring Harbor; Innis, M. A. (1990).  
PCR Protocols: A Guide to Methods a  
nd Applications, Academic Press; Ausu  
bel, F. M. (1992). Short Protocols in Mo  
lecular Biology: A Compendium of Me  
10 thods from Current Protocols in Mol  
ecular Biology, Greene Pub. Associate  
s; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols  
in Molecular Biology: A Compendium  
of Methods from Current Protocols i  
15 n Molecular Biology, Greene Pub. Asso  
ciates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR St  
rategies, Academic Press; Ausubel, F. M.  
(1999). Short Protocols in Molecular  
Biology: A Compendium of Methods fr  
20 om Current Protocols in Molecular B  
iology, Wiley, and annual updates; Sni  
nsky, J. J. et al. (1999). PCR Applicatio  
ns: Protocols for Functional Genomi  
cs, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析  
25 実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において  
関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。ある因子が再プログラム化因子である場合、その生物学的活性は、再プログラム化活性を包含する。

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮（truncated）改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子（allele）とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。「種相同体（homolog）」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。このように、本発明において使用される細胞は、改変された核酸またはポリペプチドを含んでいてもよい。

20

ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換などが挙げられる（例えば、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）。

25

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」または「組み換

えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。

原核細胞に対する「組み換えベクター」としては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもRoche Molecular Biochemicalsより市販）、pKK233-2（Pharmacia）、pSE280（Invitrogen）、pGEMEX-1 [Promega]、pQE-8（QIAGEN）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK+ (Stratagene)、pBluescript II SK(-) (Stratagene)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM BP-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia)、pETシステム (Novagen)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen)、pMAL-c2 (New England Biolabs)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (宝酒造)、pUC118 (宝酒造)、pPA1 (特開昭63-233798) などが例示される。

酵母細胞に対する「組み換えベクター」としては、YEp13 (ATCC 37115)、YEp24 (ATCC 37051)、YCp50 (ATCC 37419)、pHS19、pHS15などが例示される。

5

動物細胞に対する「組み換えベクター」としては、pcDNA1/Amp、pcDNA1、pCDM8 (いずれもフナコシより市販)、pAGE107 [特開平3-229 (Invitrogen)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pAMo、pAMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)], マウス幹細胞ウイルス (Murine Stem Cell Virus) (MSCV) に基づいたレトロウイルス型発現ベクターなどが例示される。

10

本発明において使用される「レトロウイルスベクター」としては、例えば、Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV)、Murine Stem Cell Virus (MSCV) にもとづいたレトロウイルス型発現ベクターなどが挙げられるがそれらに限定されない。

15

植物細胞に対する「組み換えベクター」としては、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクターなどが例示される。

20

昆虫細胞に対する「組み換えベクター」としては、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (すべてInvitrogen) などが例示される。

25

「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部



または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細胞は、形質転換体であってもよい。

5

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、*Escherichia* 属、*Serratia* 属、*Bacillus* 属、*Brevibacterium* 属、*Corynebacterium* 属、*Microbacterium* 属、*Pseudomonas* 属などに属する原核生物細胞、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No. 49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Escherichia coli* BL21 (DE3)、*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS、*Escherichia coli* HMS174 (DE3)、*Escherichia coli* HMS174 (DE3) pLysS、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium ammoniagenes*、*Brevibacterium* *mariophilum* ATCC14068、*Brevibacteriu*

m s a c c h a r o l y t i c u m A T C C 1 4 0 6 6、C o r y n e b a c t e r i u m g l u t a m i c u m A T C C 1 3 0 3 2、C o r y n e b a c t e r i u m g l u t a m i c u m A T C C 1 4 0 6 7、C o r y n e b a c t e r i u m g l u t a m i c u m A T C C 1 3 8 6 9、C o r y n e b a c t e r i u m a c e t o a c i d o p h i l u m A T C C 1 3 8 7 0、M i c r o b a c t e r i u m a m m o n i a p h i l u m A T C C 1 5 3 5 4、P s e u d o m o n a s s p. D-0110などが例示される。

10 本明細書において使用される場合、動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト結腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、

15 NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293（ATCC：CRL-1573）など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としてはHCT-15などが例示される。

20 本明細書において使用される場合、植物細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ダイズ、トマト、ニンジン、コムギ、オオムギ、ライムギ、アルファルファ、アマなどの植物細胞などを挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、Agrobacterium法（特開

25 昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977）、エレクトロポレーション法（特開昭60-251887）、パーティクルガン（遺

伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)などが例示される。

本明細書において使用される場合、昆虫細胞としては、*Spodoptera*  
5 *frugiperda*の卵巢細胞、*Trichoplusia ni*の卵  
巢細胞、カイコ卵巢由来の培養細胞などを用いることができる。*Spodop*  
*tera frugiperda*の卵巢細胞としてはSf9、Sf21(*Ba*  
*culovirus Expression Vectors: A Lab*  
*oratory Manual*)など、*Trichoplusia ni*の卵  
10 巢細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4(*Invitro*  
*gen*)など、カイコ卵巢由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N  
4などが例示される。

本明細書において使用される場合、組換えベクターの導入方法としては、D  
15 NAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、塩化カルシ  
ウム法、エレクトロポレーション法 [*Methods. Enzymol.*, 19  
4, 182 (1990)]、リポフェクション法、スフェロプラスト法 [*Pro*  
*c. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1929 (1978)]、酢  
酸リチウム法 [*J. Bacteriol.*, 153, 163 (1983)]、*Pr*  
20 *oc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1929 (1978) 記  
載の方法などが例示される。

本明細書において、レトロウイルスの感染方法は、例えば、*Current*  
*Protocols in Molecular Biology* 前出(特  
25 にUnits 9.9 - 9.14)などに記載されるように、当該分野に  
おいて周知であり、例えば、トリプシナイズして ES 細胞を 単一細胞懸

濁物 (single-cell suspension) にした後、ウイルス  
産生細胞 (virus-producing cells) (パッケージング細  
胞株 = packaging cell lines) の培養上清と一緒に 1  
- 2 時間共培養 (co-culture) することにより、十分量の感染細  
5 胞を得ることができる。

本明細書において使用されるゲノムまたは遺伝子座などを除去する方法にお  
いて用いられる、Cre 酵素の一過的発現、染色体上での DNA マッピングな  
どは、細胞工学別冊実験プロトコールシリーズ「FISH 実験プロトコール ヒ  
10 ト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで」松原謙一、吉川 寛 監修 秀  
潤社 (東京) などに記載されるように、当該分野において周知である。

本明細書において遺伝子発現 (たとえば、mRNA 発現、ポリペプチド発現)  
の「検出」または「定量」は、例えば、mRNA の測定および免疫学的測定方  
15 法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、  
例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法または PCR 法などが例示さ  
れる。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイター  
プレートを用いる ELISA 法、RIA 法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット  
法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA  
20 法または RIA 法などが例示される。

「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたは mRNA が  
発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いて EL  
ISA 法、RIA 法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法な  
25 どの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペ  
プチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブ

ロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。

「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

本明細書中において、「移植抗原」とは、未分化体細胞融合細胞若しくは該融合細胞から分化された細胞、組織および臓器等を特定の個体へ導入した場合に、導入された個体内において移植免疫を導入し得る抗原物質のことである。移植

10 抗原の大多数は、共優性形質として細胞膜上に発現しているが、強い拒絶反応を起こす、抗原提示分子である主要組織適合抗原（MHC）と、慢性の弱い拒絶反応を引き起こす副組織適合抗原の2つに大きく分類することができる。主要組織適合抗原系は、臓器、組織および細胞の同種移植に際し、最も強い拒絶

15 反応を引き起こす同種異系（アロ）抗原系である。この主要組織適合抗原系を支配する遺伝子群は、多数の遺伝子座を含む複合体であり、高度の多型性を有し、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）と呼ばれる。ヒトでは、第6染色体短腕上のヒト白血球抗原（HLA）、マウスでは第17染色体上のH-2遺伝子複合体がこれに相当する。MHCは調べられて全ての哺乳類、鳥類に1個存在

20 しており、ヒトおよびマウス以外では、アカゲザルのRhLA、イヌのDLA、ラットのRT1等が知られている。ヒトのMHCであるHLA抗原は、全ての有核細胞に発現しているクラスI抗原と、マクロファージ、B細胞、活性化T細胞、樹状細胞および胸腺上皮細胞等の抗原提示細胞に発現するクラスII抗原とがある。クラスI抗原は細胞内の抗原を提示するものであり、CD8陽性細胞障害性T細胞受容体（CD8<sup>+</sup>TCR）により認識される。また、ク

25 ラスII抗原は、外来の異物由来の抗原を提示し、CD4陽性ヘルパーT細胞受容体（CD4<sup>+</sup>TCR）により認識される。一方、副組織適合抗原を支配す

る遺伝子座は、単独の遺伝子座であり、多型性の程度は低い副組織適合遺伝子座（M I H）が存在する。

本発明においては、多能性幹細胞の製造に供する幹細胞（たとえば、E S細胞）中の移植抗原を欠失させることにより移植個体に対応する多能性幹細胞を製造することができる。ここで、欠失させる移植抗原は上述の主要組織適合抗原、および、副組織適合抗原の両方を含むものであり、その一部であっても全部であってもよい。即ち、この欠失させた幹細胞（たとえば、E S細胞）を用いて製造された多能性幹細胞、またはこの多能性幹細胞から分化された細胞、組織若しくは臓器を移植用とした場合に、レシピエントから受ける拒絶反応の程度が欠失させなかった場合と比べて減少されるものであれば、特に限定されない。中でも主要組織適合抗原が本発明において欠失させる移植抗原として好ましく、クラス I 抗原が特に好ましい。移植抗原の欠失は、例えば、移植抗原をコードする遺伝子を削除することにより達成することができる。遺伝子を削除する代表的な方法としては、相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング[Mansour S. L. et al., Nature 336:348-352 (1988); Capecchi M. R., TIG 5:70-76 (1989); Valancius and Smithies, Mol. Cell. Biol. 11:1402-1408 (1991); Hast y et al., Nature 350 (6351) 243-246 (1991)]等の技術を挙げることができる。

クラス I およびクラス I I MHC 抗原は、各々、 $\alpha$  および  $\beta$  の 2 つのサブユニットからなるヘテロ二量体である。本発明の移植個体に対応する多能性幹細胞は、例えば、幹細胞（たとえば、E S細胞）由来のMHC抗原のサブユニットの少なくとも 1 コピー、好ましくは両コピーを不活性化した細胞である。こ

ここで、不活性化の対象とするサブユニットは、このサブユニットが不活性化された幹細胞（たとえば、ES細胞）を体細胞と融合した後に、体細胞由来のサブユニットにより補われることのないもの、即ち、融合細胞とした後にも幹細胞（たとえば、ES細胞）由来の移植抗原が発現されないサブユニットを選択  
5 する必要がある。

この不活性化は、幹細胞（たとえば、ES細胞）由来のMHC抗原のサブユニットをコードする遺伝子、または、MHC抗原の発現に影響を及ぼす別の遺伝子を削除することにより達成され得る。MHC抗原の発現に影響を及ぼす遺  
10 伝子としては、MHC抗原発現を調節する遺伝子、例えばMHC抗原に依存した提示を調節するクラスII型遺伝子座中のTAP1、TAP2、LMP2およびLMP7遺伝子が挙げられる。例として、幹細胞（たとえば、ES細胞）由来のMHC抗原を欠く融合細胞を遺伝子ターゲティングにより作成する場合、まず幹細胞（たとえば、ES細胞）由来のMHC抗原をコードする遺伝子の一  
15 部が相同組換えされ、削除または障害を与えるような配列を含むターゲティングベクターを構築する。このベクターを、融合細胞中へエレクトロポレーション、カルシウム沈降DNA、融合、トランスフェクション、リポフェクション等の適当な方法により導入する。哺乳動物細胞を形質転換させる方法については、例えば、Keownら[Methods in Enzymology 1  
20 85:527-537 (1990)]により報告されている。形質転換された細胞の選択は、例えば、遺伝子ターゲティングを行う際に通常用いられるようにneoまたはpur等の選択マーカーを目的遺伝子の欠損領域に導入し、遺伝子ターゲティングされた細胞のみをその選択マーカーに特異的な薬剤で  
25 選択することができる。neoまたはpur等の選択マーカーの遺伝子発現が将来の遺伝子解析や医療応用に問題があると考えられる場合には、例えば、選択マーカー遺伝子をLox-P配列で挟んでおき、遺伝子ターゲティング

- された細胞にC r e 遺伝子を導入することで一過的にC r e 酵素を発現させることで、細胞工学的に選択マーカー遺伝子を除去する手法が用いられる。そのような方法は、当該分野において周知であり、本明細書において他の箇所において記載し、本明細書において引用される文献においても説明されている。
- 5 質転換された細胞はまた、その細胞が分化した場合は、MHC抗原は分化した細胞において発現することから、細胞の表面上の標的MHC抗原の不在により選択することができる。選択方法としては、例えば、補体と共に標的MHC抗原のいずれかのエピトープに対するモノクローナル抗体を利用して、この抗原を有する細胞を殺すことができる。または、適当な抗体と、リシンA鎖、アブリン、ジフテリア毒素等との接合体を用いて、この抗原を有する細胞を殺すこともできる。また、より簡便にはアフィニティークロマトグラフィーにより標的抗原を含む細胞を除去しても良い。結果として得られる細胞は、その表面上から少なくとも1つのES細胞由来のMHC抗原が除去されている。このような細胞、または該細胞から誘導された細胞、組織若しくは臓器を生体内へ導入した
- 10
- 15 した場合、元の融合細胞と比べ、幹細胞（たとえば、ES細胞）由来のMHC抗原が少ないことから移植拒絶を受ける可能性が低くなる。

- 本明細書において「再プログラム化」とは、細胞（たとえば、体細胞）に作用して、その細胞を未分化状にさせ、多能性を増加または獲得させることをいう。従って、再プログラム化の活性は、ある因子を、分化した細胞（たとえば、体細胞）に、測定すべき量を一定時間（例えば、数時間など）暴露させた後に、多能性を測定し、暴露前のその細胞の多能性と比較して、有意な差異が見出されるかどうかを判定することによって測定される。再プログラム化のレベルは、種々存在し、再プログラム化された細胞の多能性のレベルに対応する。したがって、全能性の幹細胞由来の再プログラム化因子を用いる場合には、再プログラム化は全能性に対応することがあり得る。
- 20
- 25



本明細書において、「再プログラム化因子」または「再プログラム化する因子」とは、細胞に作用し、その細胞を未分化細胞化する因子である。以下の実施例においても示されるように、ES細胞は体細胞核のインプリントを再プログラム化することはできないが、生殖細胞の発達は可能とするよう、体細胞核のエピジェネティクス状態を再プログラム化した。従って、ES細胞中にそのような再プログラム化因子が含まれることは明らかである。また、ES細胞以外の他の幹細胞にも体細胞を再プログラム化する因子がある可能性があり、本発明の再プログラム化因子はまたこれらの因子をも包含する。体細胞に作用させる

5 ES細胞由来の成分としては、ES細胞中に含まれる成分であれば特に限定されないが、細胞質成分、核成分等、また個々のRNAおよびタンパク質等が挙げられる。雑多な分子を含む細胞質成分または核成分を作用させる場合、慣用的な手段により（例えば、クロマトグラフィー等）ある程度の分画を行い、分画された各画分を体細胞に対して作用させても良い。特定の画分が再プログラム

10 化因子を含むことが判明した場合には、該画分をさらに精製し、最終的には一つの分子として特定し、それを利用することもできる。また代わりに、この再プログラム化因子が含まれる画分をそのまま、何ら精製することなく体細胞の再プログラム化に用いることも可能である。また、再プログラム化因子は、一分子が単独でそのような作用を示す場合も考え得るが、複数の分子が相互作用

15 により、体細胞を未分化様細胞へと変化させることも考えられる。従って、本発明の「再プログラム化因子」には、単一分子からなる因子、複数分子からなる因子、および、前記単一分子または複数分子が含まれる組成物が包含される。

20

本発明の再プログラム化因子のスクリーニング方法としては、ES細胞由来

25 の成分を体細胞に接触、注入等の手段により作用させ、Oct4-GFPマーカ遺伝子の発現、X染色体の活性化等の再プログラム化の指標となる活性を

基にその作用を検出し、そして、再プログラム化活性を有していた成分を選択することにより行うことができる。

本発明の「E S細胞中に含まれる再プログラム化因子」は、上述のようなスクリーニング方法によりスクリーニングし、取得することができる。再プログラム化因子は、ヒストンH3-Lys4のメチル化酵素またはメチル化に関わる因子であり得る。また、このような成分がE S細胞以外（例えば、組織幹細胞）にも含まれる可能性があるが、一度、E S細胞から上述の方法によって、再プログラム化因子が特定されれば、その再プログラム化因子を基に、その他の材料より再プログラム化因子を得ることも、製造することも可能である。例えば、上述の方法により得られた再プログラム化因子がRNAであれば、そのRNAの配列決定を行い、同じ配列のRNAを周知の手法により合成することが可能である。また、再プログラム化因子がタンパク質であった場合には、そのタンパク質に対する抗体を作製し、抗体への結合性を利用してその他、そのような因子が含まれ得る材料より再プログラム化因子を取得することができる。また代わりに、このタンパク質の部分アミノ酸配列決定を行い、該アミノ酸をコードする遺伝子とハイブリダイズするようなプローブを作製し、ハイブリダイズ法により該タンパク質をコードするcDNAおよびゲノムDNAを得ることもできる。また、プライマーを作製し、PCR法により、そのような遺伝子を増幅して取得することも考え得る。前述のいずれの方法を含む種々の方法により得られた再プログラム化因子をコードする遺伝子を用いて、周知の遺伝子組換えの手法により目的とする再プログラム化因子を製造することができる。従って、本発明の「E S細胞中に含まれる再プログラム化因子」は、必ずしもE S細胞から得る必要はなく、多能性を有する細胞（たとえば、組織幹細胞）などからも得ることができる。従って、再プログラム化因子には、体細胞を再プログラム化させ得るような全ての因子が包含される。

再プログラム化する因子をスクリーニングする方法は、適当な体細胞に対して、E S細胞由来の成分を作用させ、該成分の体細胞を再プログラム化する活性を検出し、そして、再プログラム活性を有する成分を選択することにより達成され得る。本明細書において用いられ得る体細胞としては、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞等を例示することができる。特に、これらに限定されるわけではなく、正常な染色体を有した体細胞であり、安定に増殖させることができ、再プログラム化因子の作用により多分化能を有する未分化細胞様に変化することができれば特に限定されない。特に、作用させるE S細胞由来の成分が由来する種由来であることが好ましい（例えば、E S細胞由来の成分がヒト由来である場合、ヒト由来の体細胞）。既に確立されている細胞株を用いることも可能である。

本発明の体細胞、または、幹細胞（たとえば、E S細胞）および／または多能性幹細胞より細胞、組織または臓器を製造する方法における、細胞を分化させる方法とは、その細胞の核型が保持されるような状態で細胞、組織または臓器が分化され得るのであれば特に限定されない。例えば、本実施例において示すように、胚盤胞への導入、マウス等の動物への皮下注射によりテラトーマを形成させること等により細胞、組織、および臓器へと分化させることが可能である。所望の細胞、組織または臓器は、それらの分化された胚盤胞またはテラトーマから単離することができる。インビトロで目的とする種類の細胞を得るために必要とされる細胞増殖因子、成長因子等を添加し、細胞から所望の細胞、組織または臓器を誘導してもよい。現在までに、血管、神経細胞、筋肉細胞、造血細胞、皮膚、骨、肝臓、脾臓等へのE S細胞からの誘導が報告されており、本発明の多能性幹細胞からの移植個体に対応する細胞、組織または臓器の製造においても、それらの技術を適用することができる（例えば、K a u f m a n ,

D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R., and Thomson, J. A. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 10716-21; Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V., and Wobus, A. M. (2002). Circ Res 91, 189-201)。また、本発明において、幹細胞として組織幹細胞を使用して融合細胞を作製した場合には、その融合細胞は、もとの組織幹細胞が有する多能性に類似する多能性を有し得る。

10 本発明の多能性幹細胞からの細胞、組織または臓器の製造方法における幹細胞（たとえば、ES細胞）としては、適当な個体から幹細胞（たとえば、ES細胞）を確立して用いることも可能であるが、既に確立されている、種々の生物由来の幹細胞（たとえば、ES細胞）を利用することが好ましい。例えば、マウス、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ミンク、ウサギ、アカゲザルおよびマーモセット等の霊長類、およびヒトの幹細胞（たとえば、ES細胞）を挙げることができる。好ましくは、使用する体細胞と同じ種由来の幹細胞（たとえば、ES細胞）を用いる。

20 本発明の多能性幹細胞からの細胞、組織または臓器の製造方法において使用される体細胞としては、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞等を例示することができる。特に、これらに限定されるわけではなく、正常な染色体を有した体細胞であり、幹細胞（たとえば、ES細胞）と融合された際に融合細胞として安定に増殖させることができ、多分化能を有する未分化細胞様に変化することができるれば特に限定されない。この方法により製造された細胞、組織または臓器を移植用とする場合には、移植個体より得られた体細胞を用いることが好ましい。

本明細書中の融合細胞とは、たとえば、上述のような幹細胞（たとえば、E S細胞）と体細胞との融合により作製されるものであり、安定に増殖させることができ、多分化能を有する未分化細胞のことである。このような融合細胞から、宿主幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体をうまく除いた場合、その融合細胞は体細胞由来の染色体のみを有する2倍体未分化細胞とすることができることから、その細胞は、より理想的な種々の疾病を処置するための好ましいドナーである。幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体を除く方法としては、放射線照射、薬剤処理、および遺伝子操作等を利用した方法が挙げられる。例えば、幹細胞（たとえば、E S細胞）と体細胞との融合処理を行う前に、放射線または薬剤により処理することにより、融合された後に幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体のみが壊れるようにすることができる。染色体を除く際に用いる薬剤としては例えば、ブロモデオキシウリジン（B r d U）を挙げることができる。B r d Uを用いた染色体の処理方法では、まずE S細胞をこの薬剤により処理し、体細胞と融合した後にUV照射を行う。この照射によりB r d U処理された幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体のみが除かれる。また、遺伝子操作により融合細胞中の幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体を除去する方法としては、次のような方法が考えられる。まず、予め幹細胞（たとえば、E S細胞）のゲノム中にランダムにL o x P配列を導入する。体細胞との融合後に、強制的にC r eタンパク質を発現させることにより幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体のみが除かれる。従って、このような方法を用いることによって、幹細胞（たとえば、E S細胞）由来のゲノムを一部または好ましくは全部を除去することが可能である。

本明細書において細胞の「融合」または「細胞融合」とは、互換可能に用いられ、複数の細胞が融合して細胞の多核化がおこる現象をいう。生殖細胞の受

精時など自然においてもおこるが、細胞工学上の手段の1つとしても用いられる。融合させるには、2種の相異なる細胞を化学的または物理的に融合させ、融合細胞だけを増殖させる選択培地を用いて培養する。たとえば、紫外線で感染力を失活させたウイルス（たとえば、H V J（センダイウイルス）、パラインフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルスといったパラミクソウイルスなど）を用いると、細胞融合が誘導される。化学物質によっても細胞融合は可能で、たとえば、リゾレシチン、ポリエチレングリコール（PEG）6000、グリセロールオレイン酸エステルなどが用いられる。物理的手法としては、電気刺激を利用した細胞融合（電気融合）が行なわれている。化学物質による細胞融合は、ウイルスに対する特異性に非依存性であるので好ましい。

従って、本発明において、多能性幹細胞から細胞、組織または臓器を製造する際に、幹細胞（たとえば、ES細胞）と体細胞とを融合させる方法は、幹細胞と体細胞とが接触により融合し、融合細胞を形成するような方法であれば特に限定されない。例えば、実施例に記載されるようにES細胞と体細胞とを、一定の割合、例えばES細胞と胸腺細胞との融合細胞を作る場合には1：5の割合で混合し、洗浄する。細胞をマンニトール緩衝液等の適当な緩衝液中に懸濁し、電気融合させることにより作製することができる。このような電気刺激による細胞膜の構造変化を利用した高電圧パルス細胞融合法（エレクトポレーション）[例えば、EMBO J. 1：841－845（1982）]の他に、センダイウイルス、リゾレシチン、グリセロール、オレイン酸エステル、ポリエチレングリセロール等の化学的な細胞融合促進物質を用いた細胞融合法も使用され得る。いかなる融合方法であれ、幹細胞と体細胞の融合により形成された細胞が、融合細胞として安定に増殖させることができ、体細胞由来の核が多分化能を有する未分化細胞様に変化することができれば特に限定されない。

本発明の細胞、組織または臓器を移植に用いる場合には、単独で用いることも可能であるが、既存の免疫抑制法と組み合わせて使用することもできる。例えば、免疫抑制剤、外科的手術、放射線照射等が挙げられる。まず、免疫抑制剤として主なものとして副腎皮質ステロイド薬、シクロスポリン、FK506等がある。次に外科的手術としては、例えば、リンパ節摘出、脾臓摘出、胸腺摘除、胸管ろうとが挙げられる。放射線照射には全身照射と移植片照射がある。これらを適宜組み合わせることにより、レシピエントにおける移植片に対する拒絶反応をより効率的に抑制するとが可能となる。

- 10 従って、本発明の方法の1つの実施形態では、本発明の処置方法は、拒絶反応を回避する工程をさらに包含してもよい。拒絶反応を回避する手順は当該分野において公知であり、例えば、新外科学大系、臓器移植（1992）などに記載されている。そのような方法としては、例えば、免疫抑制剤、ステロイド剤の使用などの方法が挙げられる。拒絶反応を予防する免疫抑制剤は、現在、
- 15 「シクロスポリン」（サンディミュン／ネオーラル）、「タクロリムス」（プログラフ）、「アザチオプリン」（イムラン）、「ステロイドホルモン」（プレドニン、メチルプレドニン）、「T細胞抗体」（OKT3、ATGなど）があり、予防的免疫抑制療法として世界の多くの施設で行われている方法は、「シクロスポリン、アザチオプリン、ステロイドホルモン」の3剤併用である。免疫抑制剤は、本
- 20 発明と同時期に投与されることが望ましいが、必ずしも必要ではない。従って、免疫抑制効果が達成される限り免疫抑制剤は本発明の医薬投与の前または後にも投与され得る。

- 「所望の個体由来」とは、治療または予防などある処置を行うことが所望される個体に由来することをいう。従って、ある標的個体が決まると、その個体
- 25 がもつ遺伝子情報などの情報（たとえば、ゲノム情報）、形質（表現形質など）

または機能などと実質的に同一のものを有することを所望の個体由来という。

ある起源に「直接由来しない」とは、その起源に由来しないか、またはその起源から取られたものに人工的操作（たとえば、細胞融合）を少なくとも1回  
5 行ったことを意味する。従って、ES細胞に「直接由来しない」幹細胞は、ES細胞自体ではない細胞がすべて含まれ得る。

「体細胞由来」とは、ある体細胞がもつ遺伝子情報などの情報（たとえば、ゲノム情報）、形質（表現形質など）または機能などと実質的に同一のものを有  
10 することをいう。

「クローン技術」とは、遺伝子操作を用いて「クローン」つまり遺伝的に同一な個体を作製する技術をいう。

15 本明細書において「移植片」、「グラフト」および「組織グラフト」は、交換可能に用いられ、身体の特定部位に挿入されるべき同種または異種の組織または細胞群であって、身体への挿入後その一部となるものをいう。移植片としては、例えば、臓器または臓器の一部、血管、血管様組織、皮片、心臓弁、心膜、硬膜、角膜骨片、歯、骨、脳または脳の一部などが挙げられるがそれらに限定  
20 されない。従って、移植片には、ある部分の欠損部に差し込んで欠損を補うために用いられるものすべてが包含される。移植片としては、そのドナー（donor）の種類によって、自己（自家）移植片（autograft）、同種移植片（同種異系移植片）（allograft）、異種移植片が挙げられるがそれらに限定されない。通常は、本発明の臓器、組織および細胞は、自己移植片  
25 として使用されるが、同種移植片、異種移植片として使用されてもよい。



本明細書において自己移植片または自家移植片とは、ある個体についていうとき、その個体に由来する移植片をいう。本明細書において自己移植片というときは、広義には遺伝的に同じ他個体（例えば一卵性双生児）からの移植片をも含み得る。本発明の細胞から分化させた分化細胞、組織または臓器を移植する  
5 ときのものも自己移植片の概念に含まれる。

本明細書において同種移植片（同種異系移植片）とは、同種であっても遺伝的には異なる他個体から移植される移植片をいう。遺伝的に異なることから、同種異系移植片は、移植された個体（レシピエント）において免疫反応を惹起  
10 し得る。そのような移植片の例としては、親由来の移植片などが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において異種移植片とは、異種個体から移植される移植片をいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場合、ブタからの移植片は異種移  
15 植片という。

本発明の個人対応テーラーメイド技術を用いれば、拒絶反応を実質的に生じさせないような移植片も作製することができる。なぜなら、本発明の方法により作製された移植片（例えば、組織、臓器など）は、治療目的に適合し、免疫  
20 反応惹起などの副作用が顕著に抑えられるからである。従って、従来自己移植片しか使えない場合で自己移植片を得ることが困難な状況でさえ移植治療を行うことができることは、従来技術では達成することができなかった本発明の格別の効果の一つといえる。また、本発明の個人対応テーラーメイド技術によって得られた多能性細胞は、その多能性細胞のゲノムが由来する患者のみならず、  
25 その患者以外にも用いることができる。そのような場合には、好ましくは、上述の拒絶反応を回避する方法が用いられ得る。

本明細書において「被験体」または「被検体」とは、処置（例えば、治療、予防、予後の措置）が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。「患者」、「被験体」または「被検体」は、本発明が適用される生物であればどのような生物でもよい。好ましくは、「患者」、「被験体」または「被検体」は、ヒトである。

本発明の幹細胞（たとえば、ES細胞）としては、移植個体から幹細胞を確立して用いることも可能であるが、既に確立されている、種々の生物由来の幹細胞を利用することが好ましい。例えば、マウス、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ミンク、ウサギ、アカゲザルおよびマーモセット等の霊長類、およびヒトの幹細胞を挙げることができる。好ましくは、使用する体細胞と同じ種由来の幹細胞を用いる。

本発明の体細胞としては、どのような細胞を使用することもできるが、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞等を例示することができる。ヒトを含む哺乳動物、および様々な種由来の採取された体細胞を用いることができる。特に、これらに限定されるわけではなく、正常な染色体を有した体細胞であり、ES細胞のような幹細胞と融合された際に融合細胞として安定に増殖させることができ、多分化能を有する未分化細胞様に変化することができれば特に限定されない。好ましくは移植個体より得られた体細胞を用いることが、レシピエントにおける拒絶反応が減少された未分化な体細胞融合細胞を得る上では望ましい。

本発明の未分化な体細胞融合細胞とは、上述のようなES細胞のような幹細胞と体細胞との融合により作製されるものであり、安定に増殖させることがで

き、多分化能を有する（多能性の）未分化の細胞である。

本発明のES細胞のような幹細胞と体細胞とを融合させる方法としては、ES細胞のような幹細胞と体細胞とが融合し、融合細胞を形成するような方法であれば特に限定されない。例えば、実施例に記載されるようにES細胞と体細胞とを、一定の割合、例えばES細胞と胸腺細胞との融合細胞を作る場合には1：5の割合で混合し、洗浄する。細胞をマンニトール緩衝液等の適当な緩衝液中に懸濁し、電気融合させることにより作製することができる。このような電気刺激による細胞膜の構造変化を利用した高電圧パルス細胞融合法（エレクトロポレーション）[例えば、EMBO J. 1：841－845（1982）]の他に、センダイウイルス、リゾレシチン、グリセロール、オレイン酸エステル、ポリエチレングリセロール等の化学的な細胞融合促進物質を用いた細胞融合法が公知である。いかなる融合方法であれ、ES細胞のような幹細胞と体細胞との融合により形成された細胞を融合細胞として安定に増殖させることができ、体細胞由来の核が多分化能を有する未分化細胞様に変化することができる方法であれば、本発明の多能性幹細胞の製造に利用することができる。

本発明のES細胞由来の移植抗原の一部または全部が欠失された細胞、組織または臓器の製造方法における、多能性幹細胞を分化させる方法とは、この多能性幹細胞の核型が保持されるような状態で細胞、組織または臓器が分化されるのであれば特に限定されない。例えば、本実施例において示すように、胚盤胞への導入、マウス等の動物への皮下注射によりテラトーマを形成させること等により細胞、組織、および臓器へと分化させることが可能である。所望の細胞、組織または臓器は、それらの分化された胚盤胞またはテラトーマから単離することができる。インビトロで目的とする種類の細胞を得るために必要とされる細胞増殖因子、成長因子等を添加し、細胞から所望の細胞、組織または臓

器を誘導してもよい。現在まで、血管、神経細胞、筋肉細胞、造血細胞、皮膚、骨、肝臓、膵臓等のES細胞からの誘導が報告されており、本発明の融合細胞からの移植個体に対応する細胞、組織または臓器の製造においても、それらの技術が適用できるものと考えられる。

5

(好ましい実施形態の説明)

1つの局面において、本発明は、所望のゲノムを有する、単離された多能性幹細胞を提供する。好ましくは、この多能性幹細胞は、この非ES細胞であり得る。所望のゲノムを有する非ES細胞の多能性幹細胞が提供されたことにより、ES細胞を新たに樹立することも、卵細胞を採取する必要もなしに、種々の再生治療が行えるようになった。

10

この多能性幹細胞は、好ましくは、移植抗原の少なくとも一部が欠失されており、より好ましくは、移植抗原の全部が欠失されている。移植抗原が低減していることから、本発明の多能性幹細胞は所望のゲノムを有する宿主に対して低減された免疫拒絶を有するという効果が奏される。好ましくは欠失される移植抗原は、少なくとも主要組織適合抗原を含む。より好ましくは、この主要組織適合抗原は、クラスI抗原を含む。これらの特定の抗原が欠失されていることで、免疫拒絶反応の主要な部分が低減し、副作用がかなり軽減される。

15

20

本発明の多能性幹細胞は、好ましくは、そのゲノムが再プログラム化されたものであり得る。本発明の多能性幹細胞は、1つの実施形態において、供給源として別の細胞を用い、それを再プログラム化することによって作製されたものであり得る。この別の細胞は、体細胞であり得る。この体細胞は、好ましくは、胸腺細胞、リンパ球、骨髄細胞などであり得るがそれらに限定されない。

25

別の実施形態において、本発明の多能性幹細胞は、供給源として幹細胞および体細胞を用いて、幹細胞と体細胞との融合によって作製されたものであり得る。この供給源として使用される幹細胞は、ES細胞であっても組織幹細胞であってもよいが、好ましくはES細胞である。ES細胞の全能性が本発明の多能性幹細胞に受け継がれ得るからである。

本発明の多能性幹細胞は、所望の個体（たとえば、治療、予防処置の対象）由来のゲノムを有し、かつ、その所望の個体のES細胞でも卵細胞でもないことが好ましい。所望の個体のES細胞も卵細胞も使用する必要がないことから、本発明は、この実施形態において、倫理的な問題をも克服するという格別の効果を奏する。好ましい実施形態において、本発明の多能性幹細胞は、所望の個体の体細胞由来の染色体を有する。

好ましい実施形態において、本発明の多能性幹細胞は、胚に直接由来しない。したがって、宿主から胚を取り出すという社会倫理上問題のある行為を回避することができる。好ましくは、多能性幹細胞は体細胞に由来し得る。体細胞由来であって、かつ多能性を有することから、入手が簡単で応用の幅が無限にあるという効果が奏される。

好ましい実施形態において、本発明の多能性幹細胞は、所望の個体以外の移植抗原が低減されている。より好ましくは、本発明の多能性幹細胞には、所望の個体以外の移植抗原は存在しない。1つの実施形態において、本発明の多能性幹細胞は、所望の個体の卵細胞以外の細胞由来であり得る。

1つの実施形態において、本発明の多能性幹細胞は、天然には存在しないものであることが好ましい。好ましくは、本発明の多能性幹細胞において、所望

- のゲノムは、初期胚以外の個体のものである。テラーメイドの多能性幹細胞は、目的とする個体の体細胞とゲノムは同じであるものの、多能性（好ましくは全能性）を保持していることから、そのような性質の両方を具備する細胞は天然に存在するものとはいえない。E S細胞は初期胚の未分化な細胞に由来することから、初期胚以外の状態にある（たとえば、成体）宿主からE S細胞は
- 5 原理的に樹立することができない。したがって、成体の初期胚は存在しないことから、本発明のテラーメイド多能性幹細胞は、従来技術では決して達成することができなかったものといえる。
- 10 本発明の多能性幹細胞は、好ましい実施形態において、移植抗原の一部または全部が欠失されたE S細胞と、体細胞との未分化な体細胞融合細胞である。より好ましくは、本発明の多能性幹細胞は、移植抗原の全部が欠失されたE S細胞と、体細胞との未分化な体細胞融合細胞である。好ましくは、この移植抗原は、主要組織適合抗原であり得る。ここで、好ましくは、この主要組織適合
- 15 抗原はクラス I 抗原であり得る。好ましい実施形態において、この体細胞は移植個体由来のリンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞であり得るがそれらに限定されない。ここで、好ましくは、このE S細胞およびこの体細胞の少なくとも1つはヒト由来の細胞であり得る。体細胞は、対象とする宿主と同じ種（このましくは系統）であることが好ましい。したがって、例えば、ヒトを治療対象とする場合、体細胞はヒトの細胞であることが好ましく、より好ましくは、その治療対象とするヒト個体の体細胞であり得る。ここでE S細胞は、好ましくは、体細胞と同じ種（好ましくは同じ系統）のものであり得る。したがって、ヒトを治療対象とする場合であって、体細胞がヒトの細胞であるとき、E S細胞もまたヒト細胞であることが好ましい。ただし、この場合、E S細胞は、系
- 20 統にはこだわらない。好ましくは、すでに樹立されたE S細胞（または他の多能性幹細胞）を使用することができる。したがって、本発明の多能性幹細胞も
- 25

また、供給源としての幹細胞として使用され得る。

ある実施形態において、上記体細胞および上記幹細胞の少なくとも一方は、  
5 遺伝子改変されたものであり得る。遺伝子改変は本明細書において記載される  
ように行われ得る。したがって、本発明の多能性幹細胞は、遺伝子治療と併用  
され得る。遺伝子治療は、治療または予防対象の患者の状態に応じて、周知の  
ものが適宜使用され得る。

(ゲノム再プログラム化因子)

10 本発明の好ましい実施形態において、ゲノム再プログラム化因子による体細胞  
の処理が行われ得る。本発明者らは、体細胞ゲノムがE S細胞との細胞融合  
によりどんなエピジェネティクスの修飾を受けるのかが明らかにし、再プログラ  
ム化因子および機構解析の手がかりを得た。最終的には、体細胞に再プログラ  
ム化因子を強制発現させることにより、直接多能性幹細胞化できる。

15

本発明者らは、E S細胞との細胞融合により体細胞ゲノムのクロマチン構造  
が劇的に変化するのではないかと推測し、亜種間融合細胞（domestic  
us × molossinus）での体細胞核ヒストンアセチル化の状態を解析  
した。

20

抗アセチル化ヒストンH3抗体、抗アセチル化ヒストンH4抗体、抗メチル  
化ヒストンH3-Lys4抗体、抗メチル化ヒストンH3-Lys9抗体を用  
いて体細胞、E S細胞、融合細胞の核ヒストンの修飾を把握した。次に、ヒス  
トンとDNAの相互作用を解析する目的で、これらの4種類の抗体を用いてク  
25 ロマチン免疫沈降アッセイを行った。DNA-ヒストンタンパク質複合体をそ  
れぞれの抗体で免疫反応させ回収した。回収されたDNA-ヒストンタンパク

質複合体に含まれるDNAのPCR増幅によりどのDNA領域がどのようなヒストン修飾を受けているかを明らかにした。亜種間ゲノムDNAの塩基配列多型により、体細胞核由来のゲノムが修飾を受けているか区別できる。その結果、細胞融合により体細胞ゲノムが全体的にアセチル化され緩いクロマチン構造をとることが明らかになった。注目すべき点は、再プログラム化されたゲノムではヒストンH3-Lys4が特異的にメチル化されていたことである。ヒストンH3-Lys4のメチル化はヒストンH3のアセチル化と連動することが知られている。メチル化はアセチル化よりも安定なエピジェネティクスであることから、ヒストンH3-Lys4のメチル化が再プログラム化されたゲノムの特徴的修飾と推測される。ヒストンH3-Lys4のメチル化酵素またはメチル化に関わる因子が再プログラム化因子のひとつであると考えられる(図11)。

再プログラム化因子を確認する方法としては、以下のような方法が例示される。

15

1. 体細胞と体細胞のゲノムを区別する目的で、汎用される*Mus musculus domesticus* (dom) マウスと比較してDNAの塩基配列が多型に富む亜種*M. m. molossinus* (mol) からのES細胞を樹立する。ES細胞 (dom) × 体細胞 (mol) またはES細胞 (mol) × 体細胞 (dom) の亜種間融合細胞を作る。

20

2. 体細胞、ES細胞および融合細胞を1%ホルムアルデヒド溶液で10分固定しヒストンタンパク質とDNAを架橋(ヒストン-DNA複合体)した後核タンパク質を抽出する。この核タンパク質と抗アセチル化ヒストンH3抗体、抗アセチル化ヒストンH4抗体、抗メチル化ヒストンH3-Lys4抗体および抗メチル化ヒストンH3-Lys9抗体を一晩反応させる。

25



3. 反応液をプロテインAカラムを通すことで、抗体と反応したヒストン-DNA複合体を分離する。それぞれの抗体と反応したヒストン-DNA複合体からDNAを抽出する。

5

4. 抽出したDNAをメンブランにブロット吸着する。このDNAとゲノム上に散在する反復配列B2リピート、IAPおよびマウスゲノムDNAをプローブにして反応させる。その結果、用いた全てのプローブDNAが、体細胞ゲノムではアセチル化ヒストンH3-Lys9と反応していたのに対して、ES細胞および融合細胞ゲノムではアセチル化ヒストンH3-Lys4、アセチル化ヒストンH3およびアセチル化ヒストンH4と反応していた。

10

5. 抽出したDNAを、体細胞で発現せず未分化細胞で発現されるOct4遺伝子、体細胞でも未分化細胞でも発現しないNeurofilament-MおよびL遺伝子、体細胞で発現し未分化細胞では発現しないThy-1遺伝子それぞれに特異的なgenomic PCRプライマーセットでDNAを増幅した。DNAの塩基配列多型部位の制限酵素認識の違いを利用し、融合細胞で増幅されたDNAがES細胞ゲノム由来か体細胞ゲノム由来かを決定した。その結果、遺伝子の体細胞での発現の有無に関わらず、また融合細胞での発現の有無に関わらず、融合細胞では体細胞由来ゲノムがアセチル化ヒストンH3-Lys4、アセチル化ヒストンH3およびアセチル化ヒストンH4と反応していた。上記説明では、幹細胞の例示としてES細胞を挙げたが、多能性を示す幹細胞であれば、どのような細胞でも上記説明により再プログラム化因子を確認することができる。

20

25

アセチル化ヒストンは緩いクロマチン構造を形成することが知られている。

一方、ヒストンH3-Lys4とヒストンH3-Lys9のメチル化は相補的修飾で、堅いクロマチンではヒストンH3-Lys9がメチル化され緩いクロマチンではヒストンH3-Lys4がメチル化されることが知られている。ゲノム全体に散在する反復配列および各遺伝子の融合細胞での解析は、再プログラム化体細胞ゲノムが緩いクロマチン構造を形成することを示唆している。特に、ヒストンH3-Lys4のメチル化が再プログラム化に重要な役割を果たしているようである。

したがって、本発明の別の局面において、本発明は、所望のゲノムを有する多能性幹細胞を生産する方法であって、1) その所望のゲノムを有する細胞を提供する工程；および2) その細胞を再プログラム化因子を含む組成物に晒す工程、を包含する、方法を提供する。ここで、好ましくは、上記細胞は体細胞であり得る。ここで、再プログラム化因子は、多能性幹細胞の細胞質内または核内因子として調製され得る。再プログラム化因子は、ヒストンH3-Lys4のメチル化酵素またはメチル化に関わる因子、細胞周期調節因子、DNAヘリケース、ヒストンアセチル化因子、転写因子等が挙げられるがそれらに限定されない。

(移植抗原(たとえばMHC)欠損ES細胞と体細胞との融合細胞)

本発明のひとつの局面において、本発明は、所望のゲノムを有する多能性幹細胞を生産する方法であって、1) 該幹細胞における移植抗原の一部または全部を欠失させる工程；および2) 幹細胞と該所望のゲノムを有する体細胞とを融合させる工程、を包含する、方法を提供する。好ましくは、この幹細胞は、ES細胞であり、より好ましくは、すでに樹立されたES細胞であり得る。

好ましい実施形態において、上記移植抗原は、主要組織適合抗原であり得る。

より好ましくは、この主要組織適合抗原は、クラス I 抗原であり得る。上記体細胞は、移植個体由来のリンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞であり得る。

5 本発明の多能性幹細胞の作製方法において、供給源としては、移植抗原の一部または全部が欠失された幹細胞（例えば、E S 細胞）と、体細胞との未分化な体細胞融合細胞が使用され得る。より好ましくは、供給源としては、移植抗原の全部が欠失された（例えば、E S 細胞）と、体細胞との未分化な体細胞融合細胞が使用され得る。

10 好ましい実施形態において、この体細胞は移植個体由来のリンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞であり得るがそれらに限定されない。ここで、好ましくは、このE S 細胞およびこの体細胞の少なくとも1つはヒト由来の細胞であり得る。体細胞は、対象とする宿主と同じ種（このましくは系統）であることが好ましい。したがって、例えば、ヒトを治療対象とする場合、体細胞はヒト  
15 の細胞であることが好ましく、より好ましくは、その治療対象とするヒト個体の体細胞であり得る。ここでE S 細胞は、好ましくは、体細胞と同じ種（好ましくは同じ系統）のものであり得る。したがって、ヒトを治療対象とする場合であって、体細胞がヒトの細胞であるとき、E S 細胞もまたヒト細胞であることが好ましい。ただし、この場合、E S 細胞は、系統にはこだわらない。好ま  
20 しくは、すでに樹立されたE S 細胞（または他の多能性幹細胞）を使用することができ。したがって、本発明の多能性幹細胞もまた、供給源としての幹細胞として使用され得る。

好ましい実施形態において、本発明の多能性幹細胞を作製する方法は、移植  
25 抗原を全部欠失させる工程を包含し得る。移植抗原を全部欠失させる方法としては、例えば、放射線照射、薬剤処理、および遺伝子操作等を利用した方法が

挙げられる。例えば、幹細胞（たとえば、E S細胞）と体細胞との融合処理を行う前に、放射線または薬剤により処理することにより、融合された後に幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体のみが壊れるようにすることができる。

染色体を除く際に用いる薬剤としては例えば、B r d Uが挙げられ、B r d U

5 を用いた染色体の処理方法では、まずE S細胞をこの薬剤により処理し、体細胞と融合した後にUV照射を行う。この照射によりB r d U処理された幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体のみが除かれる。また、遺伝子操作により

融合細胞中の幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体を除去する方法としては、次のような方法が考えられる。まず、予め幹細胞（たとえば、E S細胞）

10 のゲノム中にランダムにL o x P配列を導入する。体細胞との融合後に、強制的にC r eタンパク質を発現させることにより幹細胞（たとえば、E S細胞）由来の染色体のみが除かれる。従って、このような方法を用いることによって、幹細胞（たとえば、E S細胞）由来のゲノムを一部または好ましくは全部（移植抗原を含む）を除去することが可能である。

15

本明細書の1つの好ましい実施形態において、主要組織適合性抗原遺伝子複合体（MHC）欠損させたE S細胞と体細胞との融合細胞を作製することが企図される。同種で他個体への移植組織の拒絶反応に関わる分子として主要組織適合性抗原遺伝子複合体（MHC）が知られており、マウスではH-2抗原が

20 相当する。MHCは3つのクラスター、c l a s s I、c l a s s I I、

c l a s s I I Iに分類される。C D 4 T細胞への抗原提示を行う c l

a s s I 遺伝子群と、C D 8 T細胞への抗原提示を行う c l a s s

I I 遺伝子群が非自己移植細胞への拒絶反応に関わることが知られている。そこで、本発明者らはMHCのc l a s s Iおよびc l a s s I I 遺伝子群

25 を遺伝子操作により取り除いたE S細胞を作り、個体の体細胞と細胞融合した。

この体細胞-E S（MHC-）融合細胞では、体細胞ゲノム由来の自己MHC

- class Iおよびclass II抗原のみが細胞表面に提示され、非自己として認識されなくなる。自己認識のための抗原を体細胞ゲノムから、その再プログラム化活性をES (MHC-) 細胞から受け継いだ体細胞-ES (MHC-) 融合細胞はMHCテラーメイド融合細胞と言える。このMHCテラーメイドES細胞では体細胞由来のMHCが発現するため、ナチュラルキラー細胞の攻撃も受けない。MHC class I欠損マウスとMHC class II欠損マウスはすでに作製されている。これらの交配によりMHC class I/class II欠損マウスを作製するアプローチと、MHC class II欠損マウス由来のES細胞を樹立し、class I遺伝子群を相同組み換えにより欠損させた。ES (MHC-) 細胞が得、異なるマウス系統からの体細胞と融合し、体細胞-ES (MHC-) 融合細胞を作製する。ES細胞由来系統マウスと体細胞由来系統マウスに移植することで拒絶反応の有無を検討できる。
- 10
- 15 そのような方法としては以下が挙げられる (図12)。
1. H-2 class I欠損マウスとH-2 class II欠損マウスを用いてH-2 class I and II欠損マウスを作製する。作製には以下の3つのアプローチが考えられる。1) H-2 class I欠損マウスとH-2 class II欠損マウスを交配し、class Iとclass IIを共に欠損するマウスを作出する。2) H-2 class II欠損マウスから作り出したH-2 class II (-/-) ES細胞をもちいてH-2 class Iを相同組み換えにより除去したES細胞から、class Iとclass IIを共に欠損するマウスを作出する。3) H-2 class II欠損マウス体細胞由来培養細胞をもちいてH-2 class Iを相同組み換えにより除去し、体細胞核移植によりclass Iとclass IIを共に欠損するマウスを作出する。
- 20
- 25

2. H-2 class I (—/—) class II (—/—) ES細胞と体細胞または組織性幹細胞を細胞融合しMHCテラーメイドES細胞を作製する。

3. MHCテラーメイドES細胞またはそれから分化した組織細胞を体細胞の供与体に移植する。拒絶反応の有無を確認する。

4. いったんH-2 class I (—/—) class II (—/—) ES細胞マスター細胞ができれば、組み合わせる体細胞を変えることで個人に対応したMHCテラーメイドES細胞を簡単に作製できる。

#### 10 (体細胞—ES融合細胞からのES細胞ゲノムの除去)

本明細書において、拒絶反応を誘引する因子を完全に回避することがより好ましい。拒絶反応を完全に回避するためには、目的の個体の体細胞に由来するテラーメイド幹細胞を作り出す必要がある。体細胞—幹細胞（例えば、ES細胞）の融合細胞で再プログラム化された体細胞ゲノムがもとの幹細胞（例えば、ES細胞）ゲノムと同様の分化能を持つことから、融合細胞から幹細胞（例えば、ES細胞）ゲノムのみを遺伝子操作により除去すればテラーメイドES細胞ができる。本発明者らの細胞融合における体細胞由来Oct 4遺伝子の再活性化の実験（Tada et al., Curr. Biol., 2001）から、体細胞ゲノムが再プログラム化されるには融合後およそ2日間を要することが明らかになっている。つまり、ES細胞ゲノムを細胞融合後選択的に除去しなければならない。

本発明者らは、ES細胞の各染色体に最低1個のLoxP配列を導入したトランスジェニックES細胞の作製を行った（図13）。この作製は以下のようにして行った。Insulator—Polymerase II promoter—GFP—LoxP—Insulatorのコンストラクトをレトロウイ

ルスベクターで作製する(図14)。ES細胞にこのレトロウイルスを感染させ、GFPをマーカーにセルソーターでソーティングすることでトランスジェニックES細胞を濃縮する。挿入部位はDNA FISHにより検出する。このトランスジェニックES細胞と体細胞の融合細胞に、Cre酵素をトランジェントに発現するプラスミドを導入する。Cre酵素の働きで、LoxP配列同士が相同組み替えを起こし、ES細胞ゲノムに由来する染色体のみが2動原体および無動原体染色体に改変され、細胞周期を経て除去される。残るのは再プログラム化された体細胞由来の2倍体ゲノムのみとなる。これにより、個人体細胞由来のテラーメイドES細胞が作られる。いったん元になるトランスジェニックES細胞が樹立されれば、各患者個人由来の体細胞を融合に用いることにより、テラーメイドES細胞が容易に樹立可能となる。このマウスモデル実験系が成功した暁には、ヒトES細胞に応用し個人体細胞に由来するヒトテラーメイドES細胞の作製を目指す。核移植クローンと異なりヒト未受精卵を必要としない細胞融合による体細胞ゲノムの再プログラム化は、ガイドラインに沿ったES細胞応用の範疇であり、倫理問題を最小限にしつつ、再生医療に最大限の効果をもたらす新機軸のゲノム工学技術である。

そのような方法としては以下が挙げられる。

1. 遺伝子の導入効率を高めるためにレトロウイルスを使って遺伝子導入を行う。Insulator-Polymerase IIプロモーター-GFP-LoxP-Insulatorのコンストラクトをレトロウイルスベクターで作製する(図14)。Insulatorは周りの遺伝子の影響から隔離するため、Polymerase IIプロモーターはGFPの発現を程良く発現し導入遺伝子のコピー数をセルソーターでリニアに同定する目的で用いた。GFPは現時点で最も毒性の低いものを使用し、遺伝子導入されたES細胞の選択に用いる。LoxP配列のコピー数はGFPの発現量と相関をもたせてあ

る。

2. Insulator-Polymerase IIプロモーター-GFP-LoxP-Insulator遺伝子をES細胞に導入した後に、GFP遺伝子の発現強度を基準にセルソーターでトランスジェニックES細胞を分取する。この操作を数回繰り返す。

3. 遺伝子導入を複数回繰り返したES細胞をクローニングし Insulator-Polymerase IIプロモーター-GFP-LoxP-Insulatorをプローブにして染色体上にマッピングする。少なくとも1つの染色体に1個の遺伝子が導入されているトランスジェニックES細胞を選別する。

4. トランスジェニックES細胞と体細胞の融合によって得られた融合細胞にCre酵素を発現させるプラスミドを導入し、Cre酵素を一過的に発現させる。Cre酵素の働きによりLoxP配列同士が相同組み換えを起こしES細胞由来の染色体のみが2動原体または無動原体になり分裂を通じて排除される。

5. 数回の細胞分裂の後には再プログラム化された体細胞ゲノムのみが残り、テラーメイドES細胞が完成する。

- 本発明の細胞、組織または臓器を移植に用いる場合には、単独で用いることも可能であるが、既存の免疫抑制法と組み合わせて使用することもできる。例えば、免疫抑制剤、外科的手術、放射線照射等が挙げられる。まず、免疫抑制剤として主なものとして副腎皮質ステロイド薬、シクロスポリン、FK506等がある。次に外科的手術としては、例えば、リンパ節摘出、脾臓摘出、胸腺摘除、胸管ろうとが挙げられる。放射線照射には全身照射と移植片照射がある。これらを適宜組み合わせることにより、レシピエントにおける移植片に対する拒絶反応をより効率的に抑制することが可能となる。



ここで別の局面において、本発明は、所望のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した、細胞、組織または臓器を提供する。この細胞は、表皮細胞、腓実質細胞、腓管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞であり得る。好ましくは、この細胞は、筋肉細胞、軟骨細胞、上皮細胞、または神経細胞であり得る。分化させる方法は当該分野において公知であり、本明細書の実施例などおよび本明細書において引用した文献にも十分に記載されている。

10

別の好ましい実施形態において、上記組織は、筋肉、軟骨、上皮または神経のものであり得るがそれらに限定されない。好ましい実施形態において、上記臓器は、脳、脊髄、心臓、肝臓、腎臓、胃、腸および膵臓からなる群より選択される。組織および臓器に分化させる方法は当該分野において公知であり、本明細書の実施例などおよび本明細書において引用した文献にも十分に記載されている。

15

好ましい実施形態において、本発明の細胞、組織または臓器は移植に用いられる。より好ましくは、上記所望のゲノムは、移植されるべき宿主と実質的に同一である。本発明の細胞、組織または臓器を移植の際に用いると、所望のゲノムを有することから、所望の効果を達成することができ、かつ、免疫拒絶反応が低減されているかまたはまったくないという効果が奏される。

20

(医薬、それを用いる治療、予防など)

別の局面において、本発明は、所望のゲノムを有する、多能性幹細胞から分化された、細胞、組織または臓器を含む、医薬を提供する。この医薬は、その

25

ような細胞（好ましくは分化細胞）、組織または臓器を必要とする疾患、障害または状態を有する患者に対して用いることができる。そのような疾患、障害または状態としては、細胞、組織または臓器に欠陥／損傷がある場合などが挙げられる。

5

別の局面では、被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防するための医薬であって、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する、多能性幹細胞を含む、医薬が本発明によって提供される。この場合は、多能性幹細胞自体が医薬として使用されることにより、投与された環境に応じてその多能性幹細胞が所望の分化をし、その結果治療が促進され得る。所望の分化を投与された部位においてするように、分化にかかわる因子（例えば、SCF）などをあらかじめまたは同時に投与しておいてもよい。

10

上述の医薬は、本明細書において記載されるキャリアなどをさらに含み得る。

15

別の局面において、本発明は、被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する、多能性幹細胞を調製する工程；該多能性幹細胞から、該細胞、組織または臓器を分化させる工程；および該細胞、組織または臓器を該被検体へと投与する工程、を包含する、方法を提供する。ここで、疾患または障害は、新鮮な分化細胞、組織または臓器が必要であるものであればどのようなものでもよく、具体例は以下に詳述されている。ここで、実質的に同一のゲノムとは、同一性を損なわない程度（すなわち免疫応答を惹起しない程度）のレベルの相同性を有するゲノムをいう。ただし、拒絶反応を回避する工程を用いる場合には、ゲノムは、被検体のものと必ずしも同じでなくてもよい。

20

25

別の局面において、本発明は、被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞を該被検体に投与する工程、を包含する、方法を提供する。ここで、多能性幹細胞を投与する方法は、当該分野において

5 周知の方法が用いられ、投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。

10

別の局面において、本発明は、被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した、細胞、組織または臓器を含む、医薬を該被検体に投与する工程、を包含する、方法を提供する。ここで、

15 この医薬を投与する方法は、当該分野において周知の方法が用いられ、投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げ

20 られる。あるいは、医薬が臓器そのものである場合は、移植によって投与が達成される。

別の局面において、本発明は、被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防するための医薬を製造するための多能性幹細胞の使用であって、該医薬は、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した細胞、組織または臓器を含む、多能性幹細胞の使

25

用に関する。

別の局面において、本発明は、所望のゲノムを有する、多能性幹細胞を含む、  
医薬を製造するための、多能性幹細胞の使用に関する。医薬（例えば、バイオ  
5 テクノロジー製剤）の製造方法は、当該分野において周知であり、当業者は、  
当局の規制に従って、そのような製造を行うことができる。

別の局面において、本発明は、所望のゲノムを有する、多能性幹細胞から分  
化された、細胞、組織または臓器を含む、医薬を製造するための、多能性幹細  
10 胞の使用に関する。

本発明により処置され得る疾患または障害は、本発明の幹細胞が分化し得る  
分化細胞、組織または臓器の障害に関連する疾患または障害であり得る。

15 1つの実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は循環器系（血液  
細胞など）であり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が  
挙げられるがそれらに限定されない：貧血（例えば、再生不良性貧血（特に重  
症再生不良性貧血）、腎性貧血、癌性貧血、二次性貧血、不応性貧血など）、癌  
または腫瘍（例えば、白血病）およびその化学療法処置後の造血不全、血小板  
20 減少症、急性骨髄性白血病（特に、第1寛解期（H i g h - r i s k群）、第2  
寛解期以降の寛解期）、急性リンパ性白血病（特に、第1寛解期、第2寛解期以  
降の寛解期）、慢性骨髄性白血病（特に、慢性期、移行期）、悪性リンパ腫（特  
に、第1寛解期（H i g h - r i s k群）、第2寛解期以降の寛解期）、多発性  
骨髄腫（特に、発症後早期）など。

25

別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、神経系のもので

あり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：痴呆症、脳卒中およびその後遺症、脳腫瘍、脊髄損傷。

- 5 別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、免疫系のもの  
あり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：T細胞欠損症、白血病。

- 10 別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、運動器・骨格系の  
ものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げ  
られるがそれらに限定されない：骨折、骨粗鬆症、関節の脱臼、亜脱臼、捻挫、  
靱帯損傷、変形性関節症、骨肉腫、ユーイング肉腫、骨形成不全症、骨軟骨異  
形成症。

- 15 別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、皮膚系のもの  
あり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：無毛症、黒色腫、皮膚悪性リンパ腫、血管肉腫、組織  
球症、水疱症、膿疱症、皮膚炎、湿疹。

- 20 別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、内分泌系のもの  
であり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられる  
がそれらに限定されない：視床下部・下垂体疾患、甲状腺疾患、副甲状腺（上  
皮小体）疾患、副腎皮質・髄質疾患、糖代謝異常、脂質代謝異常、タンパク質  
代謝異常、核酸代謝異常、先天性代謝異常（フェニルケトン尿症、ガラクト  
ース血症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症）、無アルブミン血症、ア  
25 スコルビン酸合成能欠如、高ビリルビン血症、高ビリルビン尿症、カリクレイ  
ン欠損、肥満細胞欠損、尿崩症、バソプレッシン分泌異常、侏儒症、ウオルマ

ン病（酸リパーゼ（A c i d l i p a s e）欠損症）、ムコ多糖症V I型。

別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、呼吸器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられる  
5 がそれらに限定されない：肺疾患（例えば、肺炎、肺癌など）、気管支疾患。

別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、消化器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられる  
10 がそれらに限定されない：食道疾患（たとえば、食道癌）、胃・十二指腸疾患（たとえば、胃癌、十二指腸癌）、小腸疾患・大腸疾患（たとえば、大腸ポリープ、結腸癌、直腸癌など）、胆道疾患、肝臓疾患（たとえば、肝硬変、肝炎（A型、B型、C型、D型、E型など）、劇症肝炎、慢性肝炎、原発性肝癌、アルコール性肝障害、薬物性肝障害）、膵臓疾患（急性膵炎、慢性膵炎、膵臓癌、嚢胞性膵疾患）、腹膜・腹壁・横隔膜疾患（ヘルニアなど）、ヒルシュスプラング病。

15

別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、泌尿器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられる  
20 がそれらに限定されない：腎疾患（腎不全、原発性糸球体疾患、腎血管障害、尿細管機能異常、間質性腎疾患、全身性疾患による腎障害、腎癌など）、膀胱疾患（膀胱炎、膀胱癌など）。

別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、生殖器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられる  
25 がそれらに限定されない：男性生殖器疾患（男性不妊、前立腺肥大症、前立腺癌、精巣癌など）、女性生殖器疾患（女性不妊、卵巣機能障害、子宮筋腫、子宮腺筋症、子宮癌、子宮内膜症、卵巣癌、絨毛性疾患など）。

別の実施形態において、上記分化細胞、組織または臓器は、循環器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：心不全、狭心症、心筋梗塞、不整脈、弁膜症、心筋・心膜疾患、先天性心疾患（たとえば、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、ファロー四徴）、動脈疾患（たとえば、動脈硬化、動脈瘤）、静脈疾患（たとえば、静脈瘤）、リンパ管疾患（たとえば、リンパ浮腫）。

本発明の幹細胞によって、上述のような疾患を処置するにおいて、従来の天然物由来の幹細胞移植治療に伴う副作用（特に、異物、異種細胞に伴うもの、例えば、感染、移植片対宿主病など）が回避された。この効果は、個人対応型テーラーメイド技術が本発明によって初めて効率よく達成されたことによって、奏されるもので、従来技術では不可能であったかまたは困難であった格別の効果といえる。

別の実施形態では、本発明の多能性幹細胞は遺伝子改変されているか、または本発明の多能性幹細胞またはそれに由来する細胞、組織もしくは臓器を使用するときに、遺伝子治療が併用され得る。遺伝子治療は当該分野において周知であり、例えば、Curr Gene Ther. 2002 May; 2 (2) における複数のレビューに記載されている。そのような遺伝子治療の例としては、アデノ随伴ウイルス、センダイウイルス、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、ヘルペスシンプレックスウイルス (HSV)、アルファウイルス (Alpha virus)、レンチウイルス (Lentivirus) などを使用したものが挙げられるがそれらに限定されない。

別の実施形態では、本発明の処置方法は、さらに他の薬剤もまた投与する工

程を包含し得る。そのような薬剤は、当該分野において公知の任意の医薬であり得、例えば、そのような薬剤は、薬学において公知の任意の薬剤（例えば、抗生物質など）であり得る。当然、そのような薬剤は、2種類以上の他の薬剤であり得る。そのような薬剤としては、例えば、日本薬局方最新版、米国薬局方最新版、他の国の薬局方の最新版において掲載されているものなどが挙げられる。そのような薬剤は、好ましくは、対象となる疾患または処置に対して効果を有するものであってもよく、別の疾患または処置に対して効果を有するものであってもよい。

10      他の実施形態において、本明細書で使用される体細胞は2種類以上の細胞を含み得る。2種類以上の細胞を使用する場合、類似の性質または由来の細胞を使用してもよく、異なる性質または由来の細胞を使用してもよい。

15      本発明の処置方法において使用される細胞の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

20      本発明の処置方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間－1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

25      本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。



そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能な因子としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバント。代表的には、本発明の医薬は、単離された多能性幹細胞、またはその改変体もしくは誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0 – 8.5 の Tris 緩衝剤または pH 4.0 – 5.5 の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

本発明の医薬は、非経口的に投与され得る。あるいは、本発明の医薬は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明において使用される医薬は、発熱物質を含まない、薬学的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、細胞、組織または臓器の生存、pH、等張性、安定性などに相当な注意を払うことを条件として、当業者の技術範囲内である。

本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（日本薬局方第14版またはその最新版、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990などを参照）と、所望の程度の純度を有する細胞組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で調製され保存され得る。

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤は、レシ  
10 ピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および  
濃度において不活性であり、そして以下が挙げられる：リン酸塩、クエン酸塩、  
または他の有機酸；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量ポリペプチ  
ド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；  
15 親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシ  
ン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、  
ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキスト  
リンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マン  
ニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；なら  
びに／あるいは非イオン性表面活性化剤（例えば、Tween、プルロニック  
20 （pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG））。

本発明の1つの好ましい実施形態において、後天的に再プログラム化因子に  
所望のゲノム（例えば、治療標的の個体と実質的に同一のゲノム）を有する細  
胞（たとえば、体細胞）を暴露することによって、所望のゲノムを有する多能  
25 性幹細胞を得ることができる。

本発明の製造方法により得られる未分化な体細胞融合細胞、ならびに、該融合細胞由来の細胞、組織、または臓器は、E S細胞由来の移植抗原の一部または全部が欠失し、移植用とした場合にレシピエントにおける拒絶反応が、従来のE S細胞のみ由来の細胞、組織または臓器と比べ減少されたものであることから、心筋梗塞、パーキンソン病、糖尿病および白血病を含む多数の疾病における移植治療用の無限の材料となる。また、E S細胞の無限増殖性および多分化能の性質を維持していることから、医薬品、化粧品等の試験および製造に利用でき、ゲノム計画等により配列が明らかにされた遺伝子等の機能分析にも有効である。また、本発明の多能性幹細胞は、特定の細胞、組織または臓器に分化誘導するために必要とされる細胞増殖因子、成長因子等のスクリーニングにおいて用いることもできる。

さらに、本発明により再プログラム化に関連する分子機構について研究できるように操作できる実験系が提供された。これは、E S細胞と体細胞との融合細胞を作製することにより初めて観察することができた、インビトロにおける、E S細胞の体細胞核の少なくとも一部を再プログラム化する能力を利用するものである。胸腺細胞をE S細胞と融合した後でもH 1 9およびI g f 2 rの体細胞特異なメチル化パターンは変わらなかった。通常、この対立遺伝子特異的メチル化は、受精後の発達では維持されているが、生殖細胞の発達では保持されない[T r e m b l a y K. D. e t a l., N a t u r e G a n e t. 9 : 4 0 7 - 4 1 3 ( 1 9 9 5 ) ; S t r o g e r R. e t a l., C e l l 7 3 : 6 1 - 7 1 ( 1 9 9 3 ) ]。実際に、E G - 胸腺細胞融合細胞では、I g f 2 rを含む幾つかの刷り込まれた遺伝子の体細胞メチル化パターンは妨害され、両方の対立遺伝子がメチル化されなかった[T a d a M. e t a l., E M B O J. 1 6 : 6 5 1 0 - 6 5 2 0 ( 1 9 9 7 ) ]。この事実から、E S細胞およびE G細胞の両方が、生殖細胞の発達を可能にする体細胞核のエ

ピジェネティクスの状態を再プログラム化できる類似した細胞性因子を保持すると考えられる。しかしながら、EG細胞と異なりES細胞はインプリントは再プログラム化されない。ES×EG融合細胞中のIgf2rのメチル化分析により、EG細胞がより強力なエピジェネティクスの再プログラム化に  
5 関与する付加的な優性因子を持っていることが示唆された。実際に、ES細胞およびEG細胞は、それぞれの細胞起源の特性を反映しているようである。よって、ES細胞およびEG細胞の両方が、エピジェネティクスの再プログラム化、ならびに、初期生殖細胞および生殖腺PGC中の脱メチル化に関与する因子を同定するための有用な材料となる。

10

体細胞核を用いた動物クローンの作製では、成体となるまで生き延びるクローンの割合が非常に低い。移植前に起こる胚の喪失は、部分的には、核-細胞質相互作用の欠落によるのかもしれない[Kato Y. et al., Science 282:2095-2098 (1998); Wakayama T.  
15 et al., Nature 394:369-374 (1998)。さらに、妊娠中および誕生直後に、多くのクローン化された胎児が失われるが、この発達段階における失敗の理由の1つとしては、体細胞核の有効な再プログラム化の欠如が考えられる。試験したほとんどのESハイブリッドクローンで安定なGFP発現が観察され、この系での核の再プログラム化が正常であったことが  
20 示された。H19およびIGF2r遺伝子について、体細胞からの始原メチル化インプリントはESハイブリッドで維持され、細胞の或る種のエピジェネティクスプロファイルは細胞融合により影響されないことが示された。これは、体細胞由来の不活性X染色体が、その起源を「記憶」し、クローン化胚の栄養外胚葉細胞中での不活性化で非ランダムに選択される[Eggan K. et al., Science 290:1578-1581 (2000)]という発見によっても支持される。  
25

正常な胚発達のための能力を導く、体細胞核のエピジェネティクスの再プログラム化に関わる機構は、多くが未調査のままである。最近、SWI2/SNF2ヘリカーゼ/ATPaseファミリーのメンバーであるATRX遺伝子における変異が、哺乳動物中の何度も繰り返される配列のメチル化プロファイル  
5 を変えることが示された [Gibbons R. J. et al., Nat. Genet. 24: 368-371 (2000)]。この結果、脱メチル化は、染色体再構築の結果として起こる可能性が示唆された。ATPase依存性のDNAヘリカーゼであるISWIの母系の活性が、カエルのクローン化された体  
10 細胞における核の再プログラム化の過程で、染色体リモデラーとして機能するかもしれないことも報告されている [Kikyo N. et al., Science 289: 2360-2362 (2000)]。Xenopusの卵中で短時間インキュベートしたXenopus XTC-2上皮細胞から抽出された核は再構築され、基礎転写複合体の鍵となる成分TBPが失われる。従って、  
15 ES細胞の再プログラム化活性は、体細胞のエピジェネティクスの記憶の喪失を起こすような、ゆるい構造の染色体の形成を容易にするのかもしれない。本発明の未分化体細胞融合細胞においては、体細胞由来のインプリントが保持されているので正常な再プログラム化が行われ、EG細胞を用いた場合と比べ、動物クローンの作製においてはもちろん、移植用の細胞、組織または臓器の作  
20 製において有利である。マウスES細胞中にインプリントされたいくつかの遺伝子のエピジェネティクスの不安定性から、ヒトES細胞を臨床的に適用する前に、そのエピジェネティクスの状態を評価する必要があることが示されている [Humpherys D. et al., Science 293: 95-97 (2000)]。宿主ES細胞の染色体をうまく除けた場合、ES融合細胞  
25 は特に有用な治療手段となるである。一度、再プログラム化因子が同定されれば、それらの因子を利用することによってエピジェネティクスを操作できるよ

うになると考えられる。そのような因子の同定により、哺乳動物の胚を使用することなく、成人体細胞からのクローン化、または組織特異的幹細胞の産生が可能となる。このような技術は、細胞または組織の移植を必要とする多数の臨床適用におけるドナー細胞の産生を可能とすると考えられる。

5

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、請求の範囲によってのみ限定される。

10

## 実 施 例

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

15

### (実施例1：体細胞融合細胞の作製)

#### 1. キメラ胚の作製

##### (1) ES細胞株およびEG細胞株の樹立

ES細胞株としては、E3.5雄129/Sv胚盤胞より確立したES細胞株TMA5-5 [Isolation, Culture, and Manipulation of embryonic stem cells (pp254-290), in "Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual 2nd Edition" edited by Hogan, Beddington, Castanini and Lacy (Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA) (1994)], およびneo/lacZレポーター遺伝子を運ぶRosa26胚盤胞由来G418-耐性ES細胞株

NR-2 [Friedrich G. and Soriano P., Genes Dev. 5:1513-1523 (1991)] を用いた。また、EG細胞株としては、E12.5雌PGC [Tada T. et al., Dev. Gene. Evol. 207:551-561 (1998)] から確立したEG細胞株TMA-58G [Tada M. et al., EMBO J. 16:6510-6520 (1997)]、および、薬剤耐性遺伝子pSV2bsrのTMA-58G細胞へのトランスフェクションにより産生したブラストサイジンS塩酸塩 (BS) -耐性EG細胞株 (TMA-58G<sup>bsr</sup>) を用いた。これらの細胞を、マイトマイシンCで不活性化したマウスG418-耐性始原胚性繊維芽細胞 (PEF) フィーダー細胞 (Rosa26の12.5日齢胚の初代培養線維芽細胞より通常の方法により作製) 上のES培地 (15%ウシ胎児血清、 $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノール、および1000ユニット/ml 組換え白血病阻害因子 (LIF; ESGRO) を補ったダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中で維持した。TMA-58G<sup>bsr</sup>細胞は、 $3 \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$  BSを含有するES培地で培養した。以下の細胞融合実験では、ES細胞株およびEG細胞株は、それぞれ10継代以内のものを用いた。

## (2) 細胞融合によるハイブリッドクローンの作製

### (2) - 1. ES融合細胞

20 胸腺細胞は次の3種類の6~8週齢のマウスのものを使用した:

(A) 129/Sv-TgR (Rosa26) 26Sor (Rosa26と呼ぶ) [Friedrich G. and Soriano P., Genes Dev. 5:1513-1523 (1991)]; neo/lacZレポーター遺伝子を全身の細胞で発現している

25 (B) GOF-18/GFP (Oct4-GFPと呼ぶ) [Yoshimizu T. et al., Develop. Growth Differ. 41:6

75-684 (1999)]; 全能性および多分化性細胞でGFPを特異的に発現している

(C) (Rosa26×Oct4-GFP)F1トランスジェニックマウス(Rosa26マウスの雌に、雄Oct4-GFPトランスジェニックマウス [Yoshimizu T. et al., Develop. Growth Differ. 41: 675-684 (1999)] を交配した雑種マウス); neo/lacZ遺伝子、およびOct4-GFP遺伝子の両方を含む。

Rosa26マウスは尻尾の先端をX-gal染色することにより同定した。Oct4-GFPマウスは、次のプライマーを用いた尻尾のDNAのPCR分析により確認した: OCGOFU35, 5'-CTAGGTGAGCCGTC TTTCCA-3' (配列番号1)、およびEGFPUS23, 5'-TTCA GGGTCAGCTTGCC GTA-3' (配列番号2)。トランスジェニックマウスより得た胸腺を18ゲージの針に数回通すことにより、単一細胞の懸濁液とした。ES細胞としてTMA5-5細胞を用い、前述の3種類の胸腺細胞とを、各々、ES細胞と胸腺細胞の割合が1:5となるよう混合し、PBS中で3回洗浄した。細胞を $1 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で0.3Mマンニトール緩衝液中に懸濁した。1mmの電極ギャップを持つスライドガラスとElectro Cell Manipulator 2000 (BTX) を用いた電気融合 ( $E = 2.5 \sim 3.0 \text{ KV/cm}$ ) により融合細胞を作製した。ES培地中で1日培養した後、7~10日かけて、 $250 \mu\text{g/ml}$  G418を含有するES培地中で、不活性化G418-耐性PEFについて選択した。融合細胞クローンを採取し、広げ(継代1)、G418を補ったES培地中で3~4日培養した。ESハイブリッドクローンは、2日毎に新しい培地へ継代培養した。

25

(2)-2, ES×EG融合細胞



ES×EG融合細胞を作成するため、NR2 ES細胞およびTMA-58 G<sup>bsr</sup>EG細胞を1:1の割合で混合し、 $1 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で0.3 Mマンニトール緩衝液中に懸濁した。ES×EG融合細胞を $250 \mu\text{g/ml}$  G418および $3 \sim 4 \mu\text{g/ml}$  BSを含むES培地中で7~10日かけて  
5 選択した。

ESハイブリッドクローンは、以前の本発明者らの研究で作成されたEGハイブリッドクローン[Tada M. et al., EMBO J. 16:6510-6520 (1997)]と同じような割合( $2.8 \times 10^{-4}$ )で得つことができた。全ての型の融合細胞は親のES細胞に類似し、培養における形態的な変化は見られなかった。G-バンド法による細胞遺伝学的な分析により、  
10 試験した全13個のES融合細胞および2個のES×EGハイブリッドクローンにおいて、3つのX染色体および1つのY染色体を含む完全な染色体セットが示された。さらに、ESハイブリッドおよびES×EGハイブリッド細胞株  
15 の2~4継代目を分子分析において用いた。

### (3) 融合の確認

ES細胞が分化した細胞と融合されたことを確認するため、T細胞受容体(Tcr)βのD-J領域、免疫グロブリン(Ig)HのD-J領域、ならびに、  
20 TcrδおよびTcrγのV-J領域に特異的な4つのプライマーセットを用いたPCR増幅を、胸腺細胞とのES融合細胞から抽出したDNAを鋳型として行った。成人胸腺、ES細胞およびESハイブリッドクローンからのゲノムDNA( $0.5 \mu\text{g}$ )について、次のプライマーセットを用いて、各々の遺伝子の再配列の検出のためPCR増幅した。

25 (A) Tcrβ遺伝子のDβ2-Jβ2再配列: Dβ2, 5'-GTAGG CACCTGTGGGAAGAACT-3' (配列番号3); Jβ2, 5'

-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCGATT-3' (配列番号4)  
 [Levin S. D. et al., EMBO J. 12:1671-1680 (1993)]

(B) IgH遺伝子のD-J再配列: D $\mu$ , 5'-ACAAGCTTCAA  
 5 AGCACAAATGCCTGGCT-3' (配列番号5); J $\mu$ , 5'-GGG  
 TCTAGACTCTCAGCCGGCTCCCTCAGG-3' (配列番号  
 6) [Gu H. et al., Cell 65:47-54 (1991)]

(C) Tcr $\gamma$ 遺伝子のV $\gamma$ 7-J $\gamma$ 1再配列: V $\gamma$ 7, 5'-CTCGG  
 ATCCTACTTCTAGCTTTCT-3' (配列番号7); J $\gamma$ 1, 5'  
 10 -AAATACCTTGTGAAAACCTG-3' (配列番号8) [Liva  
 k F. et al., J. Immunol. 162:2575-2580 (1  
 999)]

(D) Tcr $\delta$ 遺伝子のV $\delta$ 5-J $\delta$ 1再配列: V $\delta$ 5, 5'-CAGAT  
 CCTTGCAGTTCATCC-3' (配列番号9); J $\delta$ 1, 5'-TCC  
 15 ACAGTCACTTGGGTTC-3' (配列番号10) [Wilson  
 A. et al., Immunity 4:37-45 (1996)]

PCR産物を1.2%アガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウムで染  
 色した。PCR産物の特異性は、Tcr $\beta$ についてはビオチン化したJ $\beta$ 2-  
 特異的オリゴプローブ; 5'-TTTCCCTCCCGGAGATTCCCT  
 20 AA-3' (配列番号11) [Levin S. D. et al., EMBO J.  
 12:1671-1680 (1993)], IgHについてはビオチン化したJ  
 H4オリゴプローブ: 5'-CCTGAGGAGACGGTGACTGAGG  
 TTCCTTG-3' (配列番号12) [Ehlich A. et al., Ce  
 11 72:695-704 (1993)]を用いてサザンハイブリダイゼーシ  
 25 ョンを行うことにより確認した。

DNAの再配列は、胸腺細胞がリンパ系細胞へ分化したことを示す明確な証拠の一つである [Fowlkes, B. J. and Pardoll D. M., Adv. Immunol. 44: 207-264 (1989)]。ハイブリッドクローンのうち45%で、Tcr $\beta$ D-J $\beta$  2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、  
5 2. 5または2. 6に特異的な再配列が見られた (図1 a)。また、幾つかのクローンにおいてIgHD-J領域 (図1 b)、ならびに、Tcr $\delta$ およびTcr $\gamma$ のV-J領域 (各々、図1 cおよび1 d) の同様な再配列が見られた。31のESハイブリッドクローンのうち全部で17個 (55%) が、少なくとも研究された再配列の一つを有していた。これらの場合、ES細胞は、リンパ系細胞に胸腺細胞核が分化した後に融合されたと考えられる。  
10

#### (4) X染色体活性

雌の体細胞では、2個のX染色体のうちの1つがX連結遺伝子の用量補償作用 (dosage compensation) によりランダムに不活性化されている。X染色体の不活性化は初期細胞分化の間に起こり、後期S期へのDNA複製の移行の遅れ、DNAの超メチル化およびヒストンH4の低アセチル化を含むエピジェネティクス変化を誘導する。体細胞核の卵母細胞への核移植により作ったクローン化胚では、雌体細胞の不活性化X染色体が再活性化される [Eggan K. et al., Science 290: 1578-15  
15 81 (2000)]。従って、両X染色体の活性化は、核の再プログラム化が起こったことを示す指標となる。X染色体活性について分析するため、本発明者らは、複製分染法 [Sugawara O. et al., Chromosoma 88: 133-138 (1983)] を用いて研究を行った (図2 a)。  
20

#### 25 (4) - 1. X染色体複製のタイミング

上記 (2) に記載のES融合細胞およびES×EG融合細胞の染色体調製物

を、細胞を  $150 \mu\text{g}/\text{ml}$  5-ブロモ-2-デオキシウリジン (BrdU) と一緒に7時間培養し、最後の1時間は  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  コルセミド存在下で培養することにより製造した。  $0.075 \text{ M}$  KCl による室温で8分間の低浸透圧処理後、細胞をメタノール：酢酸 (3 : 1) 溶液に3回浸漬して固定し、

5 風乾し、新しく調製したアクリジンオレンジ溶液で染色した。標準Bフィルターの蛍光顕微鏡下でスライドを観察した。S期後期におけるBrdUの持続的な編入、およびアクリジンオレンジ染色の後、活性X染色体および常染色体は、赤および緑に分染された因子として観察された。不活性なX染色体は、複製の遅れにより、雌の体細胞中では均一に鈍い赤色である (図2b)。核型を決定した全32個の細胞 ( $4n=80$ ) で、XY雌ES細胞、およびXX雌胸腺細胞

10 の5個の融合細胞クローンは、3つの同時に複製するX染色体を運んでいた (図2c)。

#### (4) - 2. Xist の RNA FISH

15 一連のエクソン1~7を含むXist cDNAクローンの混合物由来の cy3-dUTP (Amersham Pharmacia) によるニクトランスレーションにより調製したプローブ [Sado T. et al., Development 128:1275-1286 (2001)] を用いて、4-1と同様に得た染色体調製物をハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション、

20 および、それに続いての洗浄は以前、記述されているように行った [Lawrence J.B. et al., Cell 57:493-502 (1989)]。

(4) - 1 で得られた結果と一致し、Xist (X不活性特異的転写物) RNA が、RNA FISH (蛍光 in situ ハイブリダイゼーション) で試験した2つのESハイブリッド細胞株の3つのX染色体常に不安定に蓄積

25 (斑点) していた (図2d)。Xist 蓄積はまた、雄ES細胞の活性X染色体上でも不安定であったが、雌胸腺細胞上の不活性X染色体上では安定であった

(彩色シグナル)。体細胞核由来の不活性X染色体は、ハイブリダイゼーション後、活性X染色体の幾つかの特性を帯び、複製、およびXist発現パターンが、未分化細胞で見られるパターンと似ている。(4) - 1、および(4) - 2で示されたES融合細胞における、複製のタイミングの変化、および体細胞X染色体上のXist RNA集積は、細胞融合後、体細胞核が再プログラム化されたことを示唆する。

#### (5) 体細胞核の再プログラム化

体細胞核の再プログラム化を視覚化するために、Oct4-GFPトランス遺伝子を持つマウス株を使用した(図3)。Oct4発現は生殖細胞、移植前の胚、および移植前の初期胚の原外胚葉に特異的に観察される。従って、Oct4の活性は、全能性および/または多分化能細胞の同定のための理想的なマーカーとなる。Oct4-GFP発現パターンは内因性のOct4の発現パターンに匹敵することが知られている[Yoshimizu T. et al., Develop Growth Differ 41:675-684 (1999)]。Oct4-GFPトランスジェニックマウスの胸腺および卵巣についてOct4-GFPの発現を観察した。GFPは胸腺では検出されなかったが、生育中の卵巣中では検出された(図3a~d)。

Oct4-GFPトランスジェニックマウスの胸腺細胞をES細胞と融合し、選別することなく培養し、12時間おきにGFP発現について観察した。培養皿上の生きたES融合細胞中のGFP発現は、GFP励起源およびGFPフィルターを備えた解剖顕微鏡(Leica)下で調べることにより行った。48時間後に初めて、より大きな非発現性のコロニーの縁に、16個の細胞からなるGFP陽性のコロニーを観察した(図3e、f)。続いて、コンフルエントに達する前に、同じ培養プレート上で幾つか別のGFP陽性コロニーを観察した。

同じ条件下で培養した未融合の胸腺細胞ではGFP陽性細胞は観察されなかった。全てのES融合細胞において体細胞核の再プログラム化が起こるかどうか調べるため、G418選抜に対して耐性の(Rosa26×Oct4-GFP)F1マウスの胸腺細胞を用いた。選別の後、得られた37クローンのうち36  
5 個がGFPを発現していた(97%)。この発現は、サブカルチャーを幾代か続けても安定に維持され(図3g、h)、ES融合細胞の大部分において胸腺細胞核が再プログラム化されることが示された。細胞融合前の胸腺細胞において抑制されていたOct4-GFPトランス遺伝子が、ES融合細胞において再活性化されたということは、細胞融合後、体細胞核が再プログラム化されたとい  
10 う(4)の結果をさらに裏付けるものである。

#### (6) 胚盤胞への導入

ES融合細胞とのキメラ胚を作成するために正常な二倍体胚盤胞を用いた。ICR雄と自然にかけ合わせたICR雌の子宮より妊娠の3.5日目に二倍体  
15 胚盤胞を得た。上述の、(Rosa26×Oct4-GFP)F1マウス由来の(分化した)胸腺細胞とのハイブリッドクローン、および、Rosa26マウス由来の胸腺細胞とのハイブリッドクローンを四倍体融合細胞として用いた。十分に拡張した胚盤胞の割腔孔に四倍体融合細胞をマイクロインジェクションした(図4a)。これらの胚盤胞を偽妊娠ICR雌の子宮に移した。E7.5に  
20 おいて子宮よりキメラ胚を取り出し、Reichert膜を除き、β-ガラクトシダーゼ染色および組織学的分析を行った。

#### (6) - 1. β-ガラクトシダーゼ活性染色

β-ガラクトシダーゼ活性染色により、各キメラにおける融合細胞の相対的  
25 な寄与について確認した。培養細胞をPBSで洗浄し、1%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド、0.02%NP40および1mM MgCl<sub>2</sub>

を含有するPBSを用い、4℃で5分間固定した。同じ固定液を使用して胚、および、マウスの尻尾を4℃で3～4時間かけて固定した。試料をPBSで洗浄し、1mg/ml 4-Cl-5-Br-インドリル-β-ガラクトシダーゼ (X-gal) をPBS中のジメチルホルムアミド、5mMフェリシアン化カリウム、5mMフェリシアン化カリウムおよび2mM MgCl<sub>2</sub>中に含む反応混合物により室温で24～48時間染色した。

#### (6) - 2. 組織学的分析

X-galで染色したE7.5胚を上昇アルコール系列 (ascending alcohol series) で脱水し、JB-4プラスチック樹脂 (poly-science, Warrington, PA) 中に包埋した。2～4 μmの極薄切片を0.25%エオシンYで逆染色した。パラフィンに固定および包埋した4週齢の奇形腫を8 μmの厚さの切片にした。連続的な切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。

15

その結果、20個のE7.5胚のうち8個が陽性であり、融合細胞の限定的な寄与が示された (図4b、c)。詳細な分析により、胚性外胚葉、胚性中胚葉、および内臓内胚葉において融合細胞からの派生物が明らかにされた (図4d、e)。以上のように、ES融合細胞は、移植前の初期胚の3つの始原胚芽層 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) に分化する発達能を有していた。

20

#### (7) DNAのメチル化

次に、胸腺細胞の核の再プログラム化がインプリントされた遺伝子座におけるメチル化に影響するかどうかを胸腺細胞、ES細胞および作製したハイブリッドクローンのDNAについて、サザンブロットハイブリダイゼーションにより調べた。サザンブロットハイブリダイゼーションは、制限酵素により消化し

25

たゲノムDNAを0.8%アガロースを用いて分画し、Hybond N+膜 (Amersham) にアルカリブロットにより移し、DNAを $^{32}\text{P}$ -dCTPにより標識したプローブとハイブリダイズさせることにより行った。

5 (7) - 1. H19 遺伝子座

発現される母系のH19 遺伝子座の上流には、父系のメチル化された領域が含まれ、始原メチル化インプリントが維持されていると考えられる [Tremblay K. D. et al., Nature Genet. 9:407-413 (1995)]。胸腺細胞、ES細胞、および作製したハイブリッドクロー  
10 ンのDNA試料をBamHI、およびメチル化感受性制限酵素HhaIにより消化した。3.8 kb SacI プローブ、および2.7 kb BamHI  
プローブにより父系のメチル化された10 kbおよび2.7 kbの断片、ならびに、母系の未メチル化7.0 kbおよび1.8 kb断片が胸腺細胞およびE  
S細胞の両方からのDNAで検出された。同じパターンがハイブリッドクロー  
15 ンで見られ、メチル化された(RI=0.60)、および未メチル化(RI=0.40)バンドの相対的強度(RI)に差違はなかった(図5a)。父系のメチル化断片が2.7 kbに、そして母系の未メチル化断片が1.8 kbおよび0.8 kbに同定されるBamHIプローブを用いても同様の結果が観察された。  
全ての試料において、メチル化された(RI=0.55)、および未メチル化(RI=0.45)バンドが同じように検出された(図5a)。  
20

(7) - 2. Igf2r 遺伝子座

Igf2r 領域2のメチル化分析のためのプローブを、次のプライマーを用いてPCRにより作成した：5'-AATCGCATTAACCTCC  
25 GAACCT-3' (配列番号13) および5'-TAGCACAAAGTGGAATTGTGCTGCG-3' (配列番号14) [Stoger R. et al.



1., Cell 73:61-71 (1993)]. メチル化がインプリントされることが知られる Igf2r 遺伝子のイントロンの CpG アイランドは、発現されたアレル上でのみメチル化される [Stoger R. et al., Cell 73:61-71 (1993)]. 上述の (7) - 1 と同様に、各 DNA 試料を PvuII、およびメチル化感受性制限酵素 MluI で消化した。 330 bp の Igf2r CpG アイランドプローブにより 2.9 kb の母系由来のメチル化断片、および 2.0 kb の父系由来の未メチル化断片が、胸腺細胞および ES 細胞の両方からの DNA 中で検出された (図 5 b)。同じパターンがハイブリッドクローンでも見られ、メチル化された (RI = 0.55)、および未メチル化 (RI = 0.45) バンドの相対的強度 (RI) に差はなかった (図 5 a)。

(7) - 1 および (7) - 2 より、胸腺細胞ゲノム中の H19 上流領域、および Igf2r イントロン領域の両方の始原メチル化が、ES 細胞との融合による影響を受けないことが示された。この結果は、以前、Igf2r の母系特異的メチル化が消失した E12.5 マウス胚の生殖細胞 PGC 由来の EG 細胞と胸腺細胞とのハイブリッドクローンにおける観察 [Tada M. et al., EMBO J. 16:6510-6520 (1997)] と異なっている。ES 融合細胞における体細胞メチル化パターンの維持は、インプリント遺伝子の DNA メチル化を調節する制御機構が ES 細胞と EG 細胞とで異なっていることを示唆する。ES 細胞中では Igf2r の母系アレル特異的メチル化が観察されたが、EG 細胞、および 1:1 の ES 細胞 DNA および EG 細胞 DNA のコントロール混合物中では約 1:3 の割合 (メチル化/RI = 0.27、未メチル化/RI = 0.73) では観察されなかった。ES × EG ハイブリッドではメチル化バンドは消失し (図 5 c)、EG 細胞中の脱メチル化活性が、ES 細胞中のメチル化インプリント維持に対して優性であることが示された。

## 2. テラトーマの作製

1 のキメラ胚の作製と同様の方法により作製した T M A S - 5 E S 細胞と R  
o s a 2 6 由来の胸腺細胞の融合細胞を四倍体融合細胞として用いた。およそ  
5 1 0 0 万～5 0 0 万個の四倍体融合細胞を、S C I D マウス（日本クレア）の  
後肢そけい部に皮下注射した。皮下注射から 4 週目に奇形腫を集めた。奇形腫  
が融合細胞由来であることを X - g a l 染色により確認した。次に、奇形腫を  
ブワン固定液を用いて固定し、H a e m a t o x y l i n e - E o s i n (H  
E) 染色により、核および細胞質の両方を染色した。HE 染色の結果、筋肉、  
10 軟骨、上皮細胞、神経細胞が観察された（図 6）。

（実施例 2：再プログラム化因子の同定および利用）

（融合細胞）

電気融合、E S 細胞および融合細胞の培養ならびにその染色体分析は、当該  
15 分野において周知の標準的な手順により行った (T a d a, M., T a d a, T.,  
L e f e b v r e, L., B a r t o n, S. C. & S u r a n i, M. A.,  
*EMBO J* 16, 6510-6520. (1997))。具体的には以下のと  
おりである。

2 つの型の融合細胞の生産するために、本発明者らは、2 つの型の E S 細胞  
20 型を使用した。これらは、X 染色体上の H p r t 遺伝子が欠損した d o m s t  
i c u s X Y E S 細胞株、および M P 4 が欠損した m o l o s s i n u s  
X Y E S 細胞株を樹立した。これらの細胞は、M a n i p u l a t i n g t  
h e M o u s e E m b r y o : A L a b o r a t o r y M a n u a  
l 2 n d E d i t i o n ] e d i t e d b y B r i g i d H o g a  
25 n, R o s a B e d d i n g t o n, F r a n k C a s t a n t i n i a  
n d E l i z a b e t h L a c y, p p 253-290, C o l d S

pring Harbor (USA) に準じて樹立した。具体的には、交配後  
3.5 日齢の雌マウスの子宮から胚盤胞を洗い出した。得られた胚盤胞をマイト  
マイシンCで不活性化したマウス初代繊維芽細胞 (PEF) 上で培養した。培  
地として、MEM+F12培地 (Sigma) に15% 牛胎児血清、抗生物  
5 質、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、メルカプト  
エタノール、白血病阻害因子 (リュケミアインヒビトリーファクター=LIF)  
を加えたES培養液をもちいた(「Manipulating the Mou  
se Embryo: A Laboratory Manual 2nd  
Edition」edited by Brigid Hogan, Rosa  
10 Beddington, Frank Castantini and Eli  
zabeth Lacy, pp 253-290, Cold Spring H  
arbor (USA))。5日間培養後に胚盤胞の内部細胞塊細胞由来の増殖細  
胞をトリプシン処理により解離し、新たなPEF上で培養することで、ES細  
胞を精製した。

- 15 融合細胞株であるHxJ-17およびHxJ-18は、domesticu  
sHm1 ES細胞と、molossinus JF1マウスからの胸腺細胞  
との間の電気融合は、ES細胞およびこの体細胞を含む0.3M マンニトールバッ  
ファー浮遊液を調製し、この浮遊液を電極間1mmの融合スライド上にのせ1  
0Vの交流電流で60秒間、連続して250Vの直流電流を10 マイクロ秒  
20 で処理することによって行った。その後、処理後の混合液をPEFフィーダー  
細胞上でES培養液を用いて培養した(「多能性幹細胞の再プログラム化活性、  
In実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座4；幹細胞・クローン研究プロ  
トコール」pp191-198、羊土社(東京)などを参照)。上記のES培養  
液にヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン(HAT) 選択試薬を加えた  
25 HAT選択培養液により培養して、HAT選択培養を8日間を行った後に上述  
の融合細胞を得た。

別の融合細胞株であるMxR-2およびMxr-3は、molossinus MP4 ES細胞と、domesticus129/Sv-Rosa26トランスジェニックマウス（このマウスでは、lacZ/neoが全般的に発現する）からの胸腺細胞との電気融合は、ES細胞およびこの体細胞を含む。

- 5 3Mマンニトールバッファー浮遊液を調製し、この浮遊液を電極間1mmの融合スライド上にのせ10Vの交流電流で60秒間、連続して250Vの直流電流を10マイクロ秒で処理することによって行った。その後、処理後の混合液をPEFsフィーダー細胞上でES培養液を用いて培養した（「多能性幹細胞の再プログラム化活性、In実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座4；幹細胞・クローン研究プロトコル」pp191-198 羊土社（東京）などを参照）。上記のES培養液にジェネティシン（Sigma）選択試薬を加えたG418選択培養液により培養して、G418選択培養を8日間を行った後に上述の融合細胞を得た（Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Curr Biol 11, 1553-1558）。
- 10
- 15

#### （免疫組織化学）

- 細胞および組織のX-gal染色は、標準的な手順によって行った（Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S. C. & Surani, M. A., *EMBO J* 16, 6510-6520. (1997)）。具体的には以下のとおりである。
- 20

- 融合細胞クローン4株（HxJ-17、HxJ-18、MxJ-2およびMxJ-3）からテラトーマを形成するために、約 $1 \times 10^6$ 細胞の各クローンを免疫欠損Scidマウスの鼠蹊領域に皮下注射した。テラトーマ形成が注射後4-5週間ですべての部位に見出された。4% PFAで固定した、テラトーマ、培養細胞およびマウス脳への移植組織を、抗体との以下の免疫反応のために使用した：ウサギ抗TuJ（Babc o）、マウス抗Nestin（BD P
- 25

h a r M i n g e n)、ウサギ抗TH (CHEM I C O N)、マウス抗NF- $\kappa$ B (CHEM I C O N)、ラット抗E c a d (宝酒造 (TAKARA))、ヤギ抗 $\beta$ -G a l (B i o g e n e s i s) およびマウス抗D e s m i n (D A C O)。

5 (ゲノムのPCR、RT-PCRおよび配列決定)

融合クローンにおいてT c r  $\beta$ およびI g HのD-J DNA再配列を検出するために、ゲノムDNAを以下のプライマーセットを用いて30サイクルのPCR反応において65℃のアニーリング温度を用いて増幅した。使用したサイクルは以下のとおりであった；95℃の変性 (d e n a t u r e) 処理が30秒、プライマーのアニーリング処理が65℃で30秒、T a q 酵素による伸長処理が72℃で30秒、これを1サイクルとして30サイクルDNAのPCR増幅を行った。

15 T c r  $\beta$ , D  $\beta$  2 (5' -G T A G G C A C C T G T G G G G A A G A A A C T) (配列番号15) およびJ  $\beta$  2 (5' -T G A G A G C T G T C T C C T A C T A T C G A T T) (配列番号16)；

I g H, D  $\gamma$  1 (5' -A C A A G C T T C A A A G C A C A A T G C C T G G C T) (配列番号17) およびJ  $\gamma$  1 (5' -G G G T C T A G A C T C T C A G C C G G C T C C C T C A G G G) (配列番号18)。

20 遺伝子発現を分析するために、cDNAをオリゴdTプライマーを用いてトータルRNAから合成した。P i t xおよびN e s t i nのcDNAの検出の場合、GC緩衝液2 (TAKARA) 中のL A T a q ポリメラーゼを用いて高含量GCに対処した。プライマー配列、30サイクルのPCR反応でのアニーリング温度および増幅産物の長さは、以下のとおりである：

*Albumin*, 55°C, 567 bp, 5' -AAGGAGTGCTGCC  
ATGGTGA (配列番号19), 5' -CCTAGGTTTCTTGCAGC  
CTC (配列番号20);

5  *$\alpha$ -Fetoprotein*, 55°C, 342 bp, 5' -TCGTAT  
TCCAACAGGAGG (配列番号21), 5' -CACTCTTCCTTC  
TGGAGATG (配列番号22);

*Desmin*, 55°C, 361 bp, 5' -TTGGGGTCGCTGCG  
GTCTAGCC (配列番号23), 5' -GGTCGTCTATCAGGTT  
GTCACG (配列番号24);

10 *TH*, 60°C, 412 bp, 5' -TGTCAGAGGAGCCCGAGG  
TC (配列番号25), 5' -CCAAGAGCAGCCCATCAAAG (配  
列番号26);

*Nestin*, 55°C, 327 bp, 5' -GGAGTGTCGCTTAG  
AGGTGC (配列番号27), 5' -TCCAGAAAGCCAAGAGAA  
15 GC (配列番号28);

*Nurr1*, 55°C, 253 bp, 5' -TGAAGAGAGCGGACA  
AGGAGATC (配列番号29), 5' -TCTGGAGTTAAGAAAT  
CGGAGCTG (配列番号30);

*NF-M*, 55°C, 186 bp, 5' -GCCGAGCAGACCAAGG  
20 AGGCCATT (配列番号31), 5' -CTGGATGGTGTCCTGG  
TAGCTGCT (配列番号32);

*Pitx3*, 55°C, 373 bp, 5' -AGGACGGCTCTCTGA  
AGAA (配列番号33), 5' -TTGACCGAGTTGAAGGCGAA  
(配列番号34);

*G3pdh*, 55°C, 983 bp, 5' - TGAAGGTCGGTGTGA  
ACGGATTTGGC (配列番号35), 5' - CATGTAGGCCAT  
GAGGTCCAC (配列番号36);

*MyoD*, 60°C, 397 bp, 5' - GCCCGCGCTCCAACTG  
5 CTCTGAT (配列番号37), 5' - CCTACGGTGGTGC GCCC  
TCTGC (配列番号38);

*Myf-5*, 60°C, 353 bp, 5' - TGCCATCCGCTACAT  
TGAGAG (配列番号39), 5' - CCGGGTAGCAGGCTGTGA  
GTTG (配列番号40)。

10

プラスミドベクターへのPCR産物の直接クローニングのために、TAクローニングキット (Invitrogen) を使用した。単一のプラスミドクローンのcDNA配列を、M13リバーズおよびフォワードのプライマーを用いて独立に分析した。

15

(神経への分化および細胞移植片)

TH陽性ニューロンを効率よく産生するために、MEM培地で3回洗浄して血清およびLIFを取り除いた後、ES細胞および融合細胞をPA6間質細胞の上で8-11日にわたって培養した (Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakaniishi, S., Nishikawa, S. I., and Sasaki, Y. (2000). *Neuron* 28, 31-40)。分化したTH陽性コロニーの移植のために、PA6フィーダー層をパパイン処理により分離し、次いで平滑末端の26G Hamiltonシリンジを用いてマウス線条体にゆ  
25 っくりと注射した (Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakaniishi,

hi, S., Nishikawa, S. I., and Sasai, Y. (2000). *Neuron* 28, 31–40)。約 $5 \times 10^5$ の融合細胞由来のTH陽性細胞懸濁物を、各注射部位に移植した。2週間後、4% PFA固定後に脳全体を凍結切片を作製するために凍結した。

5

(結果)

体細胞核の細胞融合による後天的再プログラム化能は、多能性のES細胞(ES)細胞が持っている顕著な特性である(Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553–1558)。同様に、神経球細胞および骨髄細胞は、ES細胞と同時培養することにより自発的に細胞融合することによって、核内の再プログラム化を受ける。多能性細胞特異的なマーカー遺伝子Oct4-GFPおよび不活性X染色体の再活性化は、融合細胞において、体細胞から未分化状態へと再プログラム化を少なくとも部分的に行なうことの指標である。

テトラトーマおよびキメラがうまく形成されたという結果により、融合細胞が多能性を有することが示された。再プログラム化した体細胞ゲノムは、多能性を有し得るか、または、再分化過程において遺伝的に眠っている状態であり得る。

再プログラム化された体細胞ゲノムがES細胞ゲノム同様に多能性の能力を獲得したならば、個人に対応したテラーメイド型ES細胞を、治療クローニングなしで細胞融合によって行なうことができる。



本実施例において、Mus musculus domesticus Hm1 ES細胞およびM. m. molossinus JF1胸腺細胞（HxJ）の亜種間融合細胞、およびmolossinus MP4 ES細胞およびdomesticus Rosa26胸腺細胞（MxR）のものもまた、以下の実験のために作製した（図7A）。Rosa26トランスジェニックマウスから得られた体細胞ゲノムにおいてレポーター遺伝子としてlacZ/neoを普遍的に発現させた（Friedrich, G. & Soriano, P., GenES& Dev. 5, 1513-1523 (1991)）。X染色体連鎖 Hprt 遺伝子を欠損したHm1 ES細胞およびMP4 ES細胞を、molossinus 肺盤胞から新たに樹立した。DNA配列の多型性は、domesticus ゲノムとの比較でmolossinus ゲノムから容易にみつかった（ref 5）。フルセットのdomesticus 由来の染色体と、molossinus 由来の染色体とを本発明者らが試験した融合クローン中で維持した（図7B）。成体胸腺ととのES融合細胞が分化する能力を試験するために、HxJ融合細胞およびMxR融合細胞を、免疫欠損Scidマウスの鼠蹊領域に皮下注射した。MxR-2および3融合細胞株の注射後4-5週間後にテラトーマの半数は、全般に亘りlacZ/neoの融合タンパク質が発現しており、これは、X-gal染色について陽性であった。従って、テラトーマを含む組織は、融合細胞に由来していた。この切片の免疫科学的分析によって、クラスIIIβチューブリン（TuJ）、ニューロフィラメントM（NF-M）、デスミンおよびアルブミンのタンパク質発現が示された（図7D）。このことは、体細胞が中胚葉由来のときでさえ、この融合細胞が外胚葉、中胚葉および内胚葉の系統の細胞へとインビボで分化する能力を保持することを示す。本発明者らが使用した融合細胞のすべてにおいて、リンパ球に対して特異的なT細胞レセプターおよび/またはイムノグロブリンHの遺伝子のDNA再配列を分析す

ることによって、この体細胞が中胚葉由来であることが明らかになった（図7 C）。ヘマトキシリン－エオシン染色でのさらなる組織学的分析によって、このテラトーマが、軟骨、絨毛上皮および腺のような他の組織を含んでいることが示された。この融合細胞の多系統への分化は、対合様ホメオドメイン転写因子

5     3 (P i t x 3)、A l b u m i n、 $\alpha$ -f e t o p r o t e i n、M y o D、M y f - 5 および d e s m i n の遺伝子の組織特異的なmRNAの発現によって確認された（図8 A）。未分化E S細胞および融合細胞におけるこれらの遺伝子の発現がないことは、このテラトーマにおいて細胞型特異的な分化によってこれらの遺伝子発現がなされたことを示す。

10

組織特異的な遺伝子のmRNAは、この組織における再プログラム化された体細胞のゲノムから転写されたものであるかどうかを検討するために、d o m e s t i c u s の細胞およびm o l o s s i n u s の細胞ならびにそれらの亜種間融合細胞由来のテラトーマのcDNAを用いて行ったP i t x 3、A l b u m i n およびM y o D のR T - P C R の産物を配列決定および配列比較した。

15     P i t x 3 において、mRNAの322位におけるd o m e s t i c u s ゲノムにおけるグアニン（G）残基がm o l o s s i n u s ゲノムにおけるアデニン（A）残基へと単一の塩基が置換していたことが見出された（登録番号008852と称する）。配列決定した12クローンのうち、5つおよび7つが、そ

20     れぞれd o m e s t i c u s 型の配列およびm o l o s s i n u s 型の配列であることが示された。ほぼ等量の産物が、体細胞ゲノムRNAから増幅された（図8 B）。同様のパターンが内胚葉細胞特異的な遺伝子であるA l b u m i n の転写物において検出された。d o m e s t i c u s mRNAからの567bpでのR T - P C R 産物を、制限酵素N c o I で消化し、そして554bpおよび13bpの断片を検出したが、他方、m o l o s s i n u s mRNAからのR T - P C R 産物は、N c o I での消化後に381bp、173bpおよ

25

び13bpで3つのバンドとして検出された(図8C)。ESのゲノムおよび体細胞のゲノムからのAlbumin発現は、HxJおよびMxRの種間融合細胞株から分化したテラトーマにおけるバンドの強度と同じレベルあることから明らかなように、等量であったことが認められた。筋肉特異的な調節因子MyoDでは、ESゲノムおよび体細胞ゲノムからの転写物は、BssHI消化に対して感度のある配列多型によって識別された。domesticus mRNAからの395bpのRT-PCR産物は、293bpと102bpの2つのバンドに分離されたが、他方、molossinus mRNAからのRT-PCRの産物は、この消化に対して耐性であり、そしてインタクトな395bpとして検出された(図8D)。HxJ-17およびHxJ-18ならびにMxR-2およびMxR-3の垂種間融合細胞株において、体細胞ゲノム由来の転写物は、ESゲノム由来の転写物に類似することが見出された。これらのデータは、ESゲノムと同様に、再プログラム化された体細胞ゲノムが、インビトロで分化したテラトーマにおいて組織特異的なmRNAを核が転写することができる能力を獲得したことを示す。

次の課題は、この融合細胞における体細胞ゲノムがインビトロの分化誘導条件下で特定の細胞型へと分化し得るかどうかである。このことを検証するために、本発明者らは、無血清条件下でPA6間質細胞において同時培養することによって誘導された神経分化の系を用いた(Kawasaki, H. et al. Neuron 28, 31-40. (2000))。宿主のMP4 ES細胞およびMxR-3の融合細胞クローンを培養して8-11日にわたって神経分化を促進させた(図9A、B)。この誘導減少によって、融合細胞および宿主ES細胞からのほとんどのコロニーは、神経上皮幹細胞特異的なネスティンおよび有糸分裂後のニューロン特異的なTuJについて陽性の免疫反応性を示した。幹細胞特異的なE-カドヘリンについて陽性のコロニーは、ほとんど見出され

なかった。これらのデータは、融合細胞の多能性が再取得され、この融合細胞が神経系に有効に分化するように制御されたことを示す。従って、ドーパミン産生ニューロンの生産効率を改善するために、誘導培養の期間は11日まで延長された。細胞の大部分は、TuJおよびNF-Mに対する交替で陽性に染色された。チロシンヒドロキシラーゼ（TH）に対して免疫反応性であって、カテコールアミン神経伝達物質の酸性に必要な細胞が、生存したコロニーすべての内側において主に検出された。1コロニーあたり約20-50%の細胞がTH陽性であると検出された（図9C）。同様のパターンが宿主ES細胞を使用したときにも見られた。この有効な神経分化は、5回の反復実験で首尾よく進むことが確認された。中脳ドーパミン産生ニューロンのインビトロでの産生は、分化誘導後11日後に融合クローンから抽出したmRNAを用いたRT-PCRによって増幅された、TH、Nurr1およびPitx3の転写物によって再確認した（図9D）。組織特異的な遺伝子発現が、ESゲノムと再プログラム化された体細胞ゲノムとで同様かどうかを調べるために、THの転写活性因子であるPitx3のRT-PCR産物の配列決定実験を行った。配列決定した12のクローンのうち、Pitx3 mRNAのdomesticusでグアニン（G）だった残基がmolossinusではアデニン（A）残基になる単一塩基置換において、MxR亜種間融合クローンから分化したドーパミン産生ニューロンにおいて8つのクローンがmolossinus型であり、他方4つのクローンがdomesticus型であることが見出された（図9E）。HxJ融合クローンから分化したドーパミン産生ニューロンからも同様の結果が得られた。従って、インビトロ分化による中脳ドーパミン産生ニューロン特異的な転写物を発現することができる多能性の能力を獲得した融合細胞において、体細胞ゲノムは再プログラム化されていたことが示された。

本発明者らは次に、インビトロで11日間にわたり分化するように誘導され

た融合細胞に由来するドーパミン産生ニューロンが移植後にマウス脳の線条体 (s t r i a t u m) に取り込まれる能力を有するかどうかを調べた。この実験において、m o l o s s i n u s の E S 細胞と d o m e s t i c u s の 体細胞との間の M x R - 3 融合細胞は、l a c Z / n e o を有する R o s a 2 6 から得られた。融合細胞の誘導物の 1 部位あたり約  $5 \times 10^5$  細胞を線条体へと注射した。注射の間隔は、2 匹のマウス脳において標準としてブレグマを使用すると、 $A = +1.0 \text{ mm}$ 、 $L = +2.0 \text{ mm}$ 、 $V = +3.0 \text{ mm}$ であった (図 10 A)。移植片における生存細胞は、注射後 15 日で X - g a l 染色により青色陽性の細胞として検出された。T H に対する抗体および L a c Z に対する抗体を用いた、移植片の凍結切片の免疫組織化学的手法での二重染色分析によって、この融合細胞由来の神経細胞が注射部位においてドーパミン産生ニューロンに特異的な T H タンパク質を発現していたことが明らかに実証された (図 10 B および C)。従って、体細胞ゲノムは、この融合細胞が細胞の特定の型へとインビトロで分化されるように誘導された後でさえ、神経特異的な遺伝子を発現することができることが示された。これらのデータは、この融合細胞が疾患および加齢についての治療適用において置換組織を生産するために使用することができることを示す。

E S 細胞は、自己新生および多能性を有する細胞であり、その後のレシピエントへの導入後、生殖細胞を含む種々の組織へと分化することができる。従って、その多能性の特性は、インビトロ分化誘導により多くの型の置換組織を作製するための細胞供給源として適切である。しかし、E S 細胞供給源から提供された組織は、ほとんどのレシピエントに対してミスマッチであり、非自己移植拒絶を生じている。従って、治療的な移植の主な問題は、どのようにして、E S 由来の移植片に対する免疫拒絶を低減するかである。自己移植片を生産するために、個人対応型 E S 細胞または個人の成体組織幹細胞が細胞供給源とし

て適切である。個人の生体組織幹細胞は、強力な候補細胞供給源の一つである  
(Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.)。個人対応  
10 型ES細胞は、核除去された未受精卵への体細胞の核移植によって産生されたクローニングされた胚盤胞 (blastocyst) を用いて生産され得る (Rideout, W. M., 3rd, Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G. Q. & Jaenisch, R., *Cell* 109, 17-27. (2002))。しかし、ヒトの治療用クローニングは、生物医学的  
15 倫理問題という社会問題に遭遇している (Weissman, I. L., *N Engl J Med* 346, 1576-1579. (2002))。この倫理的問題を回避するために、再プログラム化された体細胞ゲノムの多能性は、少なくとも以下の3つの可能性を提供する：1) MHCクラスIおよびクラスII  
20 について欠損させたESゲノムと個人の体細胞ゲノムとを有する融合細胞は、個人患者にほぼ適合 (semi-match) することができる；2) 遺伝的に対応させたES様細胞 (多能性細胞) は、ESゲノムのターゲティング除去後に個人の体細胞を細胞融合させることによって作出され得る；3) 個人の体細胞は、ES細胞から同定された再プログラム化因子の遺伝的操作によって再  
25 プログラム化することができる。細胞融合技術は、クローニングという社会問題の可能性のある工程を行うことなく、個人の治療適用において重要な寄与をする可能性を有し得る。

(実施例 3 : 再プログラム化因子の同定)

本実施例において、体細胞ゲノムがES細胞との細胞融合によりどんなエピ  
ジェネティクスの修飾を受けるのかを調べ、再プログラム化因子および機構解  
析を行った。本発明者らは、ES細胞との細胞融合により体細胞ゲノムのクロ  
マチン構造が劇的に変化するのではないかと推測し、亜種間融合細胞 (dom  
esticus × molossinus) での体細胞核ヒストンアセチル化の  
状態を解析した。以下の実験は、Forsberg et al. Proc.  
Nat'l. Acad. Sci. USA 97, 14494-99 (2000)  
にしたがって行った。また、実際のプロトコルは、抗体の入手先であるUp s  
tate biotechnology, Chromatin immunop  
recipitation protocolにしたがった。

(核ヒストンの修飾アッセイ)

抗アセチル化ヒストンH3抗体、抗アセチル化ヒストンH4抗体、抗メチル  
化ヒストンH3-Lys4抗体、抗メチル化ヒストンH3-Lys9抗体を用  
いて体細胞、ES細胞、融合細胞の核ヒストンの修飾を把握した。次に、ヒス  
トンとDNAの相互作用を解析する目的で、これらの4種類の抗体を用いてク  
ロマチン免疫沈降アッセイを行った。

20

DNA-ヒストンタンパク質複合体をそれぞれの抗体で免疫反応させ回収し  
た。回収されたDNA-ヒストンタンパク質複合体に含まれるDNAのPCR  
増幅によりどのDNA領域がどのようなヒストン修飾を受けているかを明らかに  
した。

25

アッセイに供する細胞は、1回あたり  $2 \times 10^7 - 10^8$  細胞培養した。

1 日目に、培養培地 10 ml あたり 37 %ホルムアルデヒド 270  $\mu$ l を直接最終濃度が 1 %になるように加えた。その後、37℃で 10 分間、60 ストローク／分で振盪した。

5

次に、グリシンを最終濃度が 0.125 M になるように加えて架橋反応を停止させ、5 分間室温で放置した。

接着細胞については、培地を除き、プレートを氷冷 PBS (8 g NaCl, 10 0.2 g KCl, 1.44 g of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  および 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /1 リットル (pH 7.4)、1 mM PMSF を含む) でリンスした。1 ディッシュあたり 2 ml のトリプシンを加え、その後トリプシンを吸引して除いた。ディッシュを 10 分間 37℃でインキュベートした。トリプシン処理は、1 % FCS-PBS を加えることにより停止させた。細胞を遠心分離し、15 細胞ペレットを氷冷 PBS にて 2 回洗浄した。懸濁細胞については、細胞を遠心分離し、氷冷 PBS にて 2 回洗浄した。

次に、その細胞ペレットを 10 ml の細胞溶解緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM NaCl、0.2 % Nonidet P-40、10 mM 酪酸ナトリウム (これは脱アセチル化を防ぐために入れた) およびプロテアーゼインヒビター (コンプリートプロテアーゼインヒビター (Roche; Cat No. 1697498) を、1 錠剤を 1 ml の滅菌水に溶かし、使用時には 1/100 希釈の濃度で用いた) 中に再懸濁した。細胞の凝集が起こっていないことを確認し、10 分間氷上でインキュベートした。これ 25 を 4℃で 5 分間、5000 rpm で遠心分離した。



ペレット化した核を核溶解緩衝液（50mM Tris-HCl (pH 8.1)、10mM EDTA、1% SDS、10mM酪酸ナトリウムおよびプロテアーゼインヒビター（コンプリートプロテアーゼインヒビター（Roche ; Cat No. 1697498）を、1錠剤を1mlの滅菌水に溶かし、使用  
5 時には1/100希釈の濃度で用いた）に再懸濁し、10分間氷上でインキュベートした。

次に、サンプルを氷冷しながら超音波処理して、クロマチンが500bpの平均長になるようにした。この作業は、パワーを最大の10-15%にして、  
10 40秒間を8回行った。これを15000rpmで4℃で5分間遠心分離した。200μlの上清を新しい管に入れた。この時点で、場合により超音波処理されたクロマチンは-70℃保存した。

得られたサンプルを10倍のChIP希釈緩衝液（16.7mM Tris-HCl (pH 8.1)、167mM NaCl、1.2mM EDTA、0.01% SDS、1.1% Triton X-100、10mM酪酸ナトリウムおよびプロテアーゼインヒビター（コンプリートプロテアーゼインヒビター（Roche ; Cat No. 1697498）を、1錠剤を1mlの滅菌水に溶かし、使用時には1/100希釈の濃度で用いた）に希釈した。  
15

20

非特異的なバックグラウンドを減少するために、クロマチンサンプルに、80μlのサケ精子DNA/プロテインAアガロースを加えることによって明澄化した。4℃で1時間サンプルを回転インキュベートした。その後1000rpmで4℃で1分間サンプルを遠心分離した。得られた上清を新たな管に移した。  
25

次に、得られた上清に各種抗体（抗アセチル化ヒストンH3抗体（K9 & 14、Upstate biotechnology、ニューヨーク、USA；カタログ番号#06-599）10  $\mu$ l（抗体溶液5  $\mu$ lを2mlの反応液に用いた）；抗アセチル化ヒストンH4抗体（Upstate biotechnology、ニューヨーク、USA；カタログ番号#06-598）5  $\mu$ l（抗体溶液5  $\mu$ lを2mlの反応液に用いた）；抗ジメチル化ヒストンH3（K4またはK9）5  $\mu$ l（抗体溶液5  $\mu$ lを2mlの反応液に用いた）（Upstate biotechnology、ニューヨーク、USA；それぞれカタログ番号#07-030または#07-212）を加えた。抗体は、通常1  $\mu$ gの量を必要とした。ネガティブコントロールとして、抗体を加えないサンプルも実験した。

このようにして得られたサンプルを4℃で一晩回転した。

2日目に、サンプルにサケ精子DNA／プロテインAアガロース（Upstate biotechnology 社製（Cat No. 16-157）で、サケ精子DNA／プロテインAアガロース60  $\mu$ l加えた。これを、4℃にて1時間回転し、次いで1000 rpmで4℃で1分間遠心分離した。上清を新たな管に移した。「抗体なし」サンプルからの上清を「全入（total input）クロマチン」として保存した。

次に、ペレットを1mlの低塩洗浄緩衝液（20mM Tris-HCl（pH 8.1）、150mM NaCl、2mM EDTA、0.1% SDS、1% Triton X-100）1mlで2回洗浄し、室温で5分間回転させた。次いで、このペレットを高塩洗浄緩衝液（20mM Tris-HCl（pH

8. 1)、500mM NaCl, 2mM EDTA、0.1% SDS、1% Triton X-100) 1mlで洗浄し、室温で5分間回転させた。次いで、このペレットをLiCl洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl (pH 8.1)、0.25M LiCl, 1mM EDTA、1% Nonidet P-40、1% デオキシコール酸ナトリウム) 1mlで洗浄し、室温で5分間  
5 回転させた。最後にこのペレットを1×TE(10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA)で2回洗浄し、室温で5分間回転した。

次に、抗体／タンパク質／DNA複合体を、150 $\mu$ lの溶出緩衝液(0.1M NaHCO<sub>3</sub>、1% SDS)で2回溶出した。この作業は、手短にボルテックスし、15分間室温で振盪した。この上清を新たな管に移し、この時  
10 点でサンプルの総容量を300 $\mu$ lとした。

5M NaClを18 $\mu$ lおよび10mg/mlのRNase Aを1 $\mu$ l  
15 この溶出液に加えた。65℃で4-5時間にわたって加熱することによって逆架橋した。

次に、6 $\mu$ lの0.5M EDTA、12 $\mu$ lの1M Tris-HCl (pH 6.5) および2 $\mu$ lの10mg/ml プロテイナーゼKをこのサンプルに  
20 加え、4℃で1時間インキュベートした。

DNAを、フェノール：クロロホルム抽出により回収し、エタノール沈澱をおこなった。20 $\mu$ gのグリコーゲンをキャリアとして加えた。このサンプルを-20℃で一晩保存した。

25

3日目に、保存していたサンプルを遠心分離し、DNAを回収した。このペ

レットを70%エタノール1mlで洗浄した。DNAを乾燥し、このDNAを30 $\mu$ lの1 $\times$ TE中に再懸濁した。「total input」サンプルをさらに870 $\mu$ lの1 $\times$ TEを加えることにより希釈した。次いで、2~3 $\mu$ lを用いてPCR反応を行った。

5

(再プログラム化因子の同定)

再プログラム化因子を確認する方法として、以下の手順を行った。

1. ES細胞のゲノムと体細胞のゲノムを区別する目的で、汎用されるMus musculus domesticus (dom) マウスと比較してDNAの塩基配列が多型に富む亜種M. m. molossinus (mol) からのES細胞を実施例1に記載のように樹立した。ES細胞(dom)  $\times$  体細胞(mol) またはES細胞(mol)  $\times$  体細胞(dom) の亜種間融合細胞を作った。この融合細胞およびコントロール細胞として体細胞およびES細胞を上述の核ヒストンの修飾アッセイを行った。

2. 体細胞、ES細胞および融合細胞を1%ホルムアルデヒド溶液で10分固定しヒストンタンパク質とDNAを架橋(ヒストン-DNA複合体)した後に上述のように核タンパク質を抽出した。この核タンパク質と抗アセチル化ヒストンH3抗体、抗アセチル化ヒストンH4抗体、抗メチル化ヒストンH3-Lys 4抗体および抗メチル化ヒストンH3-Lys 9抗体を上述のように一晩反応させた。

3. 反応液をプロテインAカラムを通すことで、抗体と反応したヒストン-DNA複合体を上述のように分離した。それぞれの抗体と反応したヒストン-DNA複合体からDNAを上述のように抽出した。

4. 抽出したDNAをメンブランにプロット吸着させた。このDNAとゲノム上に散在する反復配列B 2リピート、IAPおよびマウスゲノムDNAをプローブにしてハイブリダイズ反応させた。そのプローブの配列を以下に示す。

5

B 2 リピート :

GCAAAGCCAGGTTCCTTCCTTCTTCCAAATATTTT  
CATATTTTTTTTTTAAAGATTTATTTATTCATTATA  
TGTAAGTACACTGTAGCTGTCTTCAGACACTCCA  
10 GAAGAGGGCGTCAGATCTTGTTACGTATGGTTGT  
GAGCCACCATGTGGTTGCTGGGATTTGAACTCCT  
GACCTTCGGAAGAGCAGTCGGGTGCTCTTATCCA  
CTGAGCCATCTCACCAGCCCCCTGGTTTATTTTTTT  
TAATTATTATTTGCTTTTTTGTTTATCAAGACAGGG  
15 TTTCTCTGCATAGCTCTAATTGT (配列番号 41)

IAP :

GAATTTCGATTGGTGGCCTATTTGCTCTTATTAAAA  
GAAAAAGGGGGAGATGTTGGGAGCCGCCCCCACA  
20 TTCGCCGTTACAAGATGGCGCTGACATCCTGTGT  
TCTATGTGGTAAACAAATAATCTGCGCATGTGCC  
AAGGGTATCTTATGACTACTTGTGCTCTGCCTTC  
CCCGTGACGTCAACTCGGCCGATGGGCTGCAGCC  
AATCAGGGAGTGACACGTCCGAGGCGAAGGAGAA  
25 TGCTCCTTAAGAGGGACGGGGTTTCGTTCTCTCT  
CTCTCTTGCTTTTTCTCTCTCTCTTGCTTTTTCTCT  
CTCTCTTGCTTCTTGCTCTCTTGCTTCTTGCACT

CTGTTCTGAAGATGTAAGAATAAAGCTTTGTCG

AATCACTAGTGAATTC (配列番号42)

(反復配列には下線を付した)。

- 5       その結果、用いた全てのプローブDNAが、体細胞ゲノムではアセチル化ヒ  
ストンH3-Lys9と反応していたのに対して、ES細胞および融合細胞ゲ  
ノムではアセチル化ヒストンH3-Lys4、アセチル化ヒストンH3および  
アセチル化ヒストンH4と反応していた。
- 10       5. 抽出したDNAを、体細胞で発現せず未分化細胞で発現されるOct4  
遺伝子、体細胞でも未分化細胞でも発現しないNeurofilament-M  
および-L遺伝子、体細胞で発現し未分化細胞では発現しないThy-1遺  
伝子それぞれに特異的なgenomic PCRプライマーセットでDNA  
を増幅した。使用したプライマー配列は以下のとおりである。
- 15       Oct4: フォワード   CTAGACGGGTGGGTAAGCAA (配列番  
号43)  
                                リバーズ   CAGGAGGCCTTCATTTTCAA (配列番号  
44)
- 20       Oct4 Sp1: フォワード   CGCCTCAGTTTCTCCCACC (配  
列番号45)  
                                リバーズ   AGCCTTGACCTCTGGCCC (配列番  
号46)
- Thy-1: フォワード   CTCCAAAGCCAAAACCTGTC (配列  
番号47)
- 25                                       リバーズ   GCTGACTGGAGGTGTTCCAT (配列番号  
48)
- NF-M: フォワード   GGGTGACAAGAGGTCTGGAA (配列番  
号49)

リバーズ CAGCGTG TAGCTCATCTTGG (配列番号 50)

NF-L : フォワード CAGGGAAGTTATGGGGGTCT (配列番号 51)

5 リバーズ AGAAGAACGGGGGAGAAGAG (配列番号 52)

次に、DNAの塩基配列多型部位の制限酵素認識の違いを利用し、融合細胞で増幅されたDNAがES細胞ゲノム由来か体細胞ゲノム由来かを決定した。

10 その結果、遺伝子の体細胞での発現の有無に関わらず、また融合細胞での発現の有無に関わらず、融合細胞では体細胞由来ゲノムがアセチル化ヒストンH3-Lys4, アセチル化ヒストンH3およびアセチル化ヒストンH4と反応していた。

15 アセチル化ヒストンは緩いクロマチン構造を形成することが知られている。一方、ヒストンH3-Lys4とヒストンH3-Lys9のメチル化は相補的修飾で、堅いクロマチンではヒストンH3-Lys9がメチル化され緩いクロマチンではヒストンH3-Lys4がメチル化されることが知られている。ゲノム全体に散在する反復配列および各遺伝子の融合細胞での解析は、再プログラム化体細胞ゲノムが緩いクロマチン構造を形成することを示唆している。特に、ヒストンH3-Lys4のメチル化が再プログラム化に重要な役割を果たしていることが判明した。

20

(結果)

25 亜種間ゲノムDNAの塩基配列多型により、体細胞核由来のゲノムが修飾を受けているか区別できる。本実施例の結果、細胞融合により体細胞ゲノムが全体的にアセチル化され緩いクロマチン構造をとることが明らかになった。注目

すべき点は、再プログラム化されたゲノムではヒストンH3-Lys4が特異的にメチル化されていたことである。ヒストンH3-Lys4のメチル化はヒストンH3のアセチル化と連動することが知られている。メチル化はアセチル化よりも安定なエピジェネティクスであることから、ヒストンH3-Lys4のメチル化が再プログラム化されたゲノムの特徴的修飾と推測される。ヒストンH3-Lys4のメチル化酵素またはメチル化に関わる因子が再プログラム化因子のひとつであると考えられる（図11を参照）。

（実施例4：MHC欠損型ES細胞-体細胞の融合細胞の作製）

この実施例では、MHC (H-2) class I 欠損マウスとMHC (H-2) class II 欠損マウスを用いてMHC (H-2) class I and II 欠損マウスを作製し、このマウスから得たH-2 class I (-/-) class II (-/-) ES細胞を用いて融合細胞を作製した。具体的手順は以下のとおりである（図12を参照）。

MHC class I KbDb-/-マウスは、Vugmeyer Y. et al. から分与していただいたものを使用した（Vugmeyer Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12492-12497 (1998)）。

MHC class II ノックアウトマウスは、Madsen L. et al. に分与していただいたものを使用した（Madsen L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10338-10343 (1999)）。

これら2系統のマウスを通常の飼育条件下で飼育し、交配させた。飼育条件



は、京都大学において規定される動物実験の規定を遵守した。この交配によりダブルノックアウトマウスを作製した。Class IおよびClass II遺伝子群は、0.3 cMと、同じ染色体の近傍にあることから、量遺伝子とともに欠損したマウスが得られる確率は1000頭のうち3頭である。欠損領域に特異的なPCRプライマーまたはプローブ（Class IおよびClass II遺伝子が物理的に欠損していることから、この遺伝子ゲノムをプローブとして用いた）をもちいて、ゲノムPCRまたはサザンブロット分析によりスクリーニングしたところ、実際に500頭あまり交配によって得られたものを調べたところ、2頭得られた。

10

MHC class II KOマウスは、5つの遺伝子を含む約80 kbにおよぶ領域を欠損していた。このマウス胚からES細胞を樹立した。樹立したES細胞で、MHC class I KbDbのノックアウトを行った。ノックアウトの方法は、Vugmeyster et al. 前出にしたがった。得られたダブルノックアウトES細胞を胚盤胞に注入してキメラマウスを作製した。キメラマウスの作製は、Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual 2nd, Hogan B., et al. CSHL Press USAにしたがった。キメラマウスの交配によって得られたダブルノックアウトの個体から、ダブル

15

20

ノックアウトES細胞を樹立した。

次に、このダブルノックアウトES細胞と、胸腺細胞とを融合させて融合細胞を作製した。細胞融合の方法は、実施例2に記載されるように、Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S. C. & Surani, M. A., *EMBO J* 16, 6510-6520. (1997)に従って行った。

25

細胞融合によって得られた融合細胞のゲノムを実施例 2 に記載の方法と同様に調査することによって、この融合細胞における体細胞ゲノムがインビトロの分化誘導条件下で特定の細胞型へと分化し得るかどうかを調べた。そのアッセイは、実施例 2 に記載の方法に従って行った。そのアッセイ方法は以下のとおりである。

2 倍体の細胞は 1 遺伝子に対して 2 つの遺伝子座（父方および母方由来）を有する。それぞれを相同組換えにより除去させた。この手順は、除去した遺伝子×2 の薬剤選択マーカーを用いて行った。C l a s s I および C l a s s I I 遺伝子を除去する場合、初めに除去した遺伝子座に n e o 遺伝子が、その対立遺伝子を除去するために p u r o 遺伝子を他選択マーカーに用いることで培養条件下で C l a s s I および C l a s s I I 遺伝子遺伝子を完全に除去することができた。このように、ダブルロックアウトを作製する場合も、通常のロックアウトを異なる選択マーカーを用いて 2 度繰り返すだけでよいことが明らかになった。

この実施例での融合細胞クローンを培養して 8 - 1 1 日にわたって神経分化を促進させた。この誘導減少によって、融合細胞および宿主 E S 細胞からのほとんどのコロニーは、神経上皮幹細胞特異的なネスティンおよび有糸分裂後のニューロン特異的な T u J について陽性の免疫反応性を示した。幹細胞特異的な E - カドヘリンについて陽性のコロニーは、ほとんど見出されなかった。これらのデータは、融合細胞の多能性が再取得され、この融合細胞が神経系に有効に分化するように制御されたことを示す。従って、ドーパミン産生ニューロンの生産効率を改善するために、誘導培養の期間を 1 1 日まで延長した。細胞の大部分は、T u J および N F - M に対する交替で陽性に染色された。チロシ

ンヒドロキシラーゼ（TH）に対して免疫反応性であって、カテコールアミン神経伝達物質の産生に必要な細胞が、生存したコロニーすべての内側において主に検出された。1コロニーあたり約20－50％の細胞がTH陽性であると検出された。同様のパターンが宿主ES細胞を使用したときにも見られた。この有効な神経分化は、5回の反復実験で首尾よく進むことが確認された。中脳ドーパミン産生ニューロンのインビトロでの産生は、分化誘導後11日後に融合クローンから抽出したmRNAを用いたRT-PCRによって増幅された、TH、Nurr1およびPitx3の転写物によって再確認した。組織特異的な遺伝子発現が、ESゲノムと再プログラム化された体細胞ゲノムとで同様かどうかを調べるために融合細胞から回収したRNAからのRT-PCR産物でRT-PCR産物の配列決定実験を行った。配列決定した12のクローンのうち、7クローンが再プログラム化された体細胞ゲノムに由来することが見いだされた。融合クローンから分化したドーパミン産生ニューロンからも同様の結果が得られた。従って、インビトロ分化によるドーパミン産生ニューロン特異的な転写物を発現することができる多能性の能力を獲得した融合細胞において、体細胞ゲノムは再プログラム化されていたことが示された。MHC欠損ES細胞と体細胞との融合細胞ではMHC産物が体細胞由来であるか、ES細胞由来であるかを区別する必要はない。ES細胞ではMHCの遺伝子が物理的に除去されていることからそのような遺伝子は発現しようがないからである。

20

本発明者らは次に、インビトロで11日間にわたり分化するように誘導された融合細胞に由来するドーパミン産生ニューロンが移植後にマウス脳の線条体（striatum）に取り込まれる能力を有するかどうかを実施例2と同様に調べた。移植片における生存細胞は、注射後15日でX-gal染色により青色陽性の細胞として検出された。THに対する抗体およびLacZに対する抗体を用いた、移植片の凍結切片の免疫組織化学的手法での二重染色分析によ

25

- って、この融合細胞由来の神経細胞が注射部位においてドーパミン産生ニューロンに特異的なTHタンパク質を発現していたことが明らかに実証された。従って、体細胞ゲノムは、この融合細胞が細胞の特定の型へとインビトロで分化されるように誘導された後でさえ、神経特異的な遺伝子を発現することができ
- 5 ることが示された。これらのデータは、MHC融合欠損融合細胞が疾患および加齢についての治療適用において置換組織を生産するために使用することができる可能性を示す。

(ヒトにおける適用)

- 10 ヒト細胞を用いる場合、ヒトを宿主として欠損細胞を作製することは倫理的に問題があることから、すべての操作を培養条件下で行った。2倍体の細胞は1遺伝子に対して2つの遺伝子座をもつ(父方および母方由来)。従って、それぞれを相同組換えにより除去した。具体的には、除去した遺伝子×2の薬剤選択マーカーがあれば可能である。たとえばC l a s s IおよびC l a s s
- 15 I I遺伝子を除去する場合、初めに除去した遺伝子座にn e o遺伝子が、その対立遺伝子を除去するためにp u r o遺伝子を選択マーカーに用いることで培養条件下でC l a s s IおよびC l a s s I I遺伝子を完全に除去することができた。また、初めに除去した遺伝子座にn e o遺伝子を導入し、高濃度のG418で選択すると対立遺伝子をn e o遺伝子に置き換えることができること
- 20 も見出した。

- このようにして得た細胞を用いてE S由来MHC欠損融合細胞を作製した。この融合細胞について、組織特異的な遺伝子発現が、E Sゲノムと再プログラム化された体細胞ゲノムとで同様かどうかを調べた。この融合細胞から回収し
- 25 たRNAからのR T - P C R産物の配列決定実験を行った。配列決定した12のクローンのうち、7クローンが再プログラム化された体細胞ゲノムに由来す

ることが見いだされた。

ここで再プログラム化されたヒト由来の多能性幹細胞を用いて、予備的な種々の分化実験を行ったところ、血管、神経細胞、筋肉細胞、造血細胞、皮膚、  
5 骨、肝臓、膵臓などに分化することが見出された。

(実施例5：ゲノム除去型の個体対応型テラーメイドES細胞の作製)

拒絶反応を完全に回避するためには個体の体細胞に由来するテラーメイド多能性幹細胞を作り出す必要がある。次に、ES細胞由来のゲノム全体が、細胞融合後に完全に除去される融合細胞を作製した。  
10

体細胞－ES融合細胞で再プログラム化された体細胞ゲノムがES細胞ゲノムと同様の分化能を持つことから、融合細胞からES細胞ゲノムのみを遺伝子操作により除去すればテラーメイド多能性幹細胞ができる。本発明者らの細胞融合における体細胞由来Oct4遺伝子の再活性化の実験(Tada et al., Curr. Biol., 2001)から、体細胞ゲノムが再プログラム化されるには融合後およそ2日間を要することが明らかになっている。つまり、ES細胞ゲノムを細胞融合後選択的に除去しなければならない。  
15

この点に注目して、本発明者らは、ES細胞の各染色体に最低1個のLoxP配列を導入したトランスジェニックES細胞の作製した。Insulator-Polymerase IIプロモーター-GFP-LoxP-Insulatorのコンストラクトをレトロウイルスベクター(Moloney Murine Leukemia Virus (MLV)あるいはMurine Stem Cell Virus (MSCV)にもとづいたレトロウイルス型発現ベクター)で作製した(図14)。Insulatorは周りの遺伝子  
20  
25

の影響から隔離するため、Polymerase IIプロモーターはGFPの発現を程良く発現し導入遺伝子のコピー数をセルソーターでリニアに同定する目的で用いた。GFPは現時点で最も毒性の低いもの(hGFP (Clontechn))を使用し、遺伝子導入されたES細胞の選択に用いた。LoxP  
5 配列のコピー数はGFPの発現量と相関をもたせた。作製は、Chung, J. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 575-580 (1997) にしたがって行った。このコンストラクトはLTR-pol IIプロモーター-hGFP-LoxP-LTR (Insulator) という構造をしていた (図14)。

10

まず、ES細胞は、上述の実施例に記載のように作製した。このES細胞にこのレトロウイルスをトリプシナイズして ES 細胞を単一細胞懸濁物 (single-cell suspension) にした後、ウイルス産生細胞 (パッケージング細胞株) の培養上清と一緒に 1-2 時間共培養するとい  
15 う条件下で感染させ、GFPをマーカーにセルソーター (FACS Vantage (BD Biosciences)) でソーティングすることでトランスジェニックES細胞を濃縮した。ソーティングは、Insulator-Polymerase IIプロモーター-GFP-LoxP-Insulator 遺伝子をES細胞に導入した後に、GFP遺伝子の発現強度を基準にセル  
20 ーターでトランスジェニックES細胞を分取した。この操作を数回繰り返した。

挿入部位はDNA FISHにより検出した。DNA FISHは、細胞工  
学別冊実験プロトコールシリーズ「FISH 実験プロトコール ヒト・ゲノム解  
析から染色体・遺伝子診断まで」松原謙一、吉川 寛 監修 秀潤社 (東京)  
25 を参照して行った。

遺伝子導入を複数回繰り返したES細胞をクローニングしInsulator-Polymerase IIプロモーター-GFP-LoxP-Insulatorをプローブにして染色体上にマッピングした。少なくとも1つの染色体に1個の遺伝子が導入されているトランスジェニックES細胞を選別した。

5

次に体細胞を上述の実施例のように得た。このトランスジェニックES細胞とこの体細胞との融合細胞を、上述の実施例と同様の条件で作製した。このように作製した融合細胞に、Cre酵素を一過的に発現するプラスミド (Pgk1またはCAGのプロモーター制御下にCre酵素の遺伝子をつないだプラスミドを環状にしたもの) をエレクトロポレーション法またはリポフェクション法で導入した。プラスミドは、一過的な発現一過的 (導入後3-5日) にCre酵素を発現したが、その後分解された。Cre酵素の働きで、LoxP配列同士が相同組換えを起こし、ES細胞ゲノムに由来する染色体のみが2動原体または無動原体染色体に改変され、細胞周期を経て細胞分裂により除去された。

10 除去されていたことは、上述のように各々の細胞に特異的なプライマーおよびプローブを用いて確認した。数回の細胞分裂の後に、残るのは再プログラム化された体細胞由来の2倍体ゲノムのみとなった。したがって、再プログラム化された体細胞ゲノムが残ったことになる。これにより、個体の体細胞由来のテ

15 ーラーメイド多能性幹細胞が作製されたことになる。

20

いったん元になるトランスジェニックES細胞が樹立されれば、各患者個人由来の体細胞を融合に用いることにより、テラーメイドES細胞が容易に樹立可能となる。したがって、この実施例では、このマウスモデル実験系で首尾よくテラーメイドES細胞が樹立されたことになる。この技術は、マウスの

25 みならず、他の生物 (特に、ヒトを含む哺乳動物) にも応用可能であることから、ヒトES細胞に応用しヒトの個人の体細胞に由来するヒトテラーメイド

多能性幹細胞の作製も可能である。

核移植クローンと異なりヒト未受精卵を必要としない細胞融合による体細胞ゲノムの再プログラム化は、ガイドラインに沿ったES細胞応用の範疇であり、倫理問題を最小限にしつつ、再生医療に最大限の効果をもたらす新機軸のゲノム工学技術である。したがって、この技術は、従来技術では達成不可能であった格別な効果を奏するものである。

(実施例6：造血細胞の分化細胞、組織、臓器への分化)

次に、上述の実施例で作製した多能性幹細胞からの造血幹細胞への分化または精製ができることを確認した。K a u f m a n, D. S., H a n s o n, E. T., L e w i s, R. L., A u e r b a c h, R., and T h o m s o n, J. A. (2001). H e m a t o p o i e t i c c o l o n y - f o r m i n g c e l l s d e r i v e d f r o m h u m a n e m b r y o n i c s t e m c e l l s. P r o c N a t l A c a d S c i U S A 98, 10716-21に従って、同様の実験を行ったところ、造血幹細胞へと分化した細胞が分化細胞集団に存在していることが見出された。従って、本発明の多能性幹細胞は、造血幹細胞への分化能を保持していることが判明した。また、この造血幹細胞は、実際に臨床応用に有用である。

20

(実施例7：筋肉細胞への分化細胞、組織、臓器への分化)

次に、上述の実施例で作製した多能性幹細胞からの筋肉細胞への分化または精製ができることを確認した。B o h e l e r, K. R., C z y z, J., T w e e d i e, D., Y a n g, H. T., A n i s i m o v, S. V., and W o b u s, A. M. (2002). D i f f e r e n t i a t i o n o f p l u r i p o t e n t e m b r y o n i c s t e m c e l l s i n t



- o cardiomyocytes. Circ Res 91, 189-201に従って、同様の実験を行ったところ、筋肉細胞へと分化した細胞が分化細胞集団に存在していることが見出された。従って、本発明の多能性幹細胞は、筋肉細胞への分化能を保持していることが判明した。また、この筋肉細胞は、
- 5 実際に臨床応用に有用である。

- 以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その
- 10 内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明は、免疫的拒絶反応を惹起せず、卵細胞を材料とせずに、疾病を処置
- 15 するためのドナーとなり得る細胞、組織および臓器を効率的に確立するという画期的な有用性を有する。本発明は、従来技術では達成することができなかった成体の個人と同じゲノムを有する多能性幹細胞を提供することができた。従って、本発明は、従来問題となっていた原理的問題および倫理問題をも回避し、免疫拒絶反応も回避し、簡便に作製できる個人対応型テーラーメイド型幹細胞
- 20 を提供することから、産業上におけるその意義は深い。

## 請求の範囲

1. 所望のゲノムを有する、単離された多能性幹細胞。
- 5 2. 非ES細胞である、請求項1に記載の多能性幹細胞。
3. 移植抗原の少なくとも一部が欠失された、請求項1に記載の多能性幹細胞。
4. 移植抗原の全部が欠失された、請求項1に記載の多能性幹細胞。
- 10 5. 前記移植抗原は、少なくとも主要組織適合抗原を含む、請求項1に記載の多能性幹細胞。
6. 前記主要組織適合抗原は、クラスI抗原を含む、請求項3に記載の多能性
- 15 幹細胞。
7. 前記ゲノムは再プログラム化されている、請求項1に記載の多能性幹細胞。
8. 細胞を再プログラム化することによって作製された、請求項1に記載の多
- 20 能性幹細胞。
9. 前記細胞は、体細胞である、請求項8に記載の多能性幹細胞。
10. 幹細胞と体細胞との融合によって作製された、請求項1に記載の多能性
- 25 幹細胞。

- 1 1. 前記幹細胞は、E S細胞である、請求項 1 0 に記載の多能性幹細胞。
- 1 2. 前記幹細胞は、組織幹細胞である、請求項 1 0 に記載の多能性幹細胞。
- 5 1 3. 所望の個体由来のゲノムを有し、かつ、該所望の個体のE S細胞でも卵細胞でもない、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 1 4. 所望の個体の体細胞由来の染色体を有する、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 10 1 5. 胚に直接由来しない、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 1 6. 体細胞由来の、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 15 1 7. 所望の個体以外の移植抗原が低減された、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 1 8. 所望の個体の卵細胞以外の細胞由来の、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 20 1 9. 前記所望のゲノムは、初期胚以外の状態の個体のものである、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 2 0. 移植抗原の一部または全部が欠失されたE S細胞と、体細胞との未分化な体細胞融合細胞である、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。
- 25 2 1. 移植抗原の全部が欠失されたE S細胞と、体細胞との未分化な体細胞融

合細胞である、請求項 1 に記載の多能性幹細胞。

22. 前記移植抗原は、主要組織適合抗原である、請求項 20 に記載の多能性幹細胞。

5

23. 前記主要組織適合抗原はクラス I 抗原である、請求項 22 に記載の多能性幹細胞。

24. 前記体細胞は移植個体由来のリンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞である、請求項 20 に記載の多能性幹細胞。

10

25. 前記 ES 細胞および前記体細胞の少なくとも 1 つはヒト由来の細胞である、請求項 20 に記載の多能性幹細胞。

26. 前記体細胞はヒト由来の細胞である、請求項 20 に記載の多能性幹細胞。

15

27. 前記体細胞および前記幹細胞の少なくとも一方は、遺伝子改変されたものである、請求 20 に記載の多能性幹細胞。

28. 所望のゲノムを有する多能性幹細胞を生産する方法であって、

20

1) 該幹細胞における移植抗原の一部または全部を欠失させる工程；および

2) 幹細胞と該所望のゲノムを有する体細胞とを融合させる工程、

を包含する、方法。

29. 前記幹細胞は、ES 細胞である、請求項 28 に記載の方法。

25

30. 前記ES細胞は、樹立されたES細胞である、請求項28に記載の方法。

31. 前記移植抗原は、主要組織適合抗原である、請求項28に記載の方法。

5 32. 前記主要組織適合抗原は、クラスI抗原である、請求項31に記載の方法。

33. 前記体細胞は、移植個体由来のリンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞である、請求項28に記載の方法。

10

34. 前記幹細胞および前記体細胞の少なくとも1つはヒト由来の細胞である、請求項28に記載の方法。

15

35. 前記移植抗原を全部欠失させる工程を包含する、請求項28に記載の方法。

36. 所望のゲノムを有する多能性幹細胞を生産する方法であって、

1) 該所望のゲノムを有する細胞を提供する工程；および

2) 該細胞を再プログラム化因子を含む組成物に晒す工程、

20

を包含する、方法。

37. 前記細胞は、体細胞である、請求項36に記載の方法。

25

38. 前記再プログラム化因子は、ヒストンH3 Lys 4メチル化に直接的または間接的に関連する細胞周期調節因子、DNAヘリカーゼ、ヒストンアセチル化因子および転写因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子に

よって調製される、請求項 3 6 に記載の方法。

3 9. 所望のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した、細胞、組織または臓器。

5

4 0. 前記細胞は、筋肉細胞、軟骨細胞、上皮細胞、または神経細胞である、請求項 3 9 に記載の細胞。

4 1. 前記組織は、筋肉、軟骨、上皮または神経のものである、請求項 3 9 に記載の組織。

10

4 2. 前記臓器は、脳、脊髄、心臓、肝臓、腎臓、胃、腸および脾臓からなる群より選択される、請求項 3 9 に記載の臓器。

4 3. 前記細胞、組織または臓器は移植に用いられるものである、請求項 3 9 に記載の細胞、組織または臓器。

15

4 4. 前記所望のゲノムは、移植されるべき宿主と実質的に同一である、請求項 3 9 に記載の細胞、組織または臓器。

20

4 5. 所望のゲノムを有する、多能性幹細胞から分化された、細胞、組織または臓器を含む、医薬。

4 6. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防するための医薬であって、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する、多能性幹細胞を含む、医薬。

25

47. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、

該被検体と実質的に同一のゲノムを有する、多能性幹細胞を調製する工程；

5 該多能性幹細胞から、該細胞、組織または臓器を分化させる工程；および

該細胞、組織または臓器を該被検体へと投与する工程、

を包含する、方法。

48. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、

10

該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞を該被検体に投与する工程、

を包含する、方法。

49. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防する方法であって、

15

該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した、細胞、組織または臓器を含む、医薬を該被検体に投与する工程、

を包含する、方法。

20

50. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処置または予防するための医薬を製造するための多能性幹細胞の使用であって、

該医薬は、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞を含む、多能性幹細胞の使用。

25

51. 被検体における細胞、組織または臓器の欠陥による疾患または障害を処

置または予防するための医薬を製造するための多能性幹細胞の使用であって、該医薬は、該被検体と実質的に同一のゲノムを有する多能性幹細胞から分化した細胞、組織または臓器を含む、多能性幹細胞の使用。

- 5 5 2. 所望のゲノムを有する、多能性幹細胞を含む、医薬を製造するための、多能性幹細胞の使用。

5 3. 所望のゲノムを有する、多能性幹細胞から分化された、細胞、組織または臓器を含む、医薬を製造するための、多能性幹細胞の使用。

10

5 4. ヒストンH3-Lys4のメチル化酵素またはメチル化に関わる因子、細胞周期因子、DNAヘリカーゼ、ヒストンアセチル化因子および転写因子からなる群より選択される、再プログラム化因子。

- 15 5 5. 前記因子は、転写因子Sp1もしくはSp3またはそのコファクターである、請求項54に記載の再プログラム化因子。



図 1

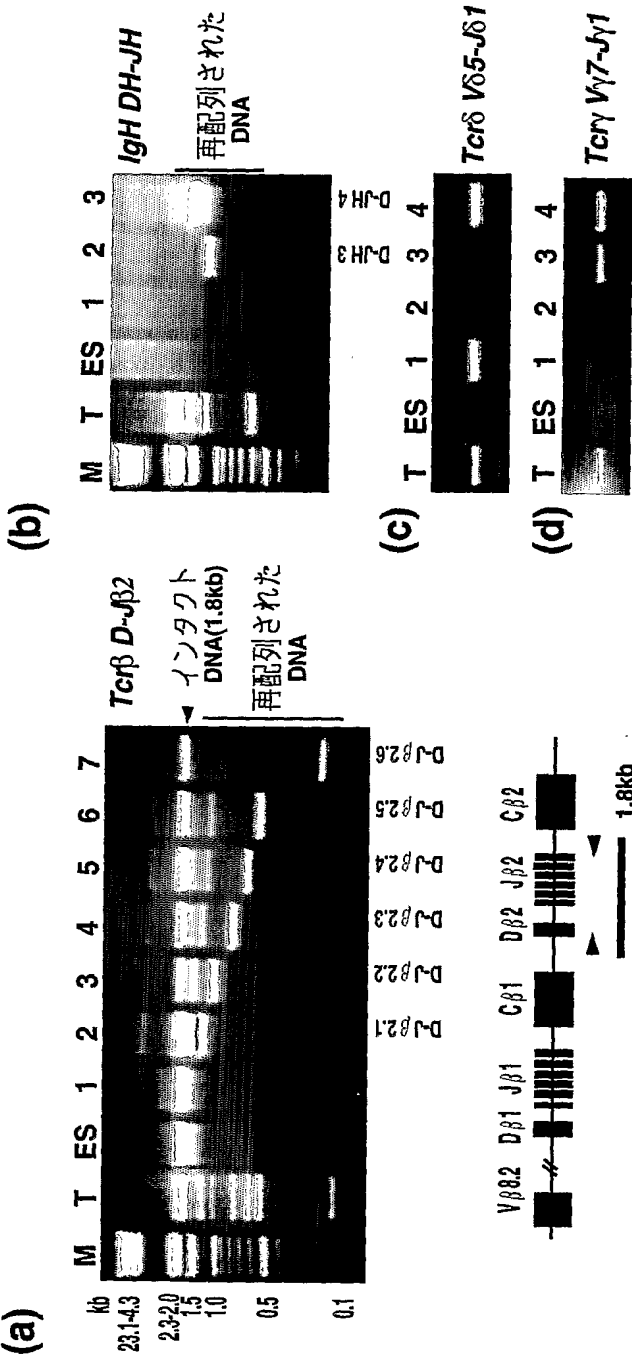


図 2

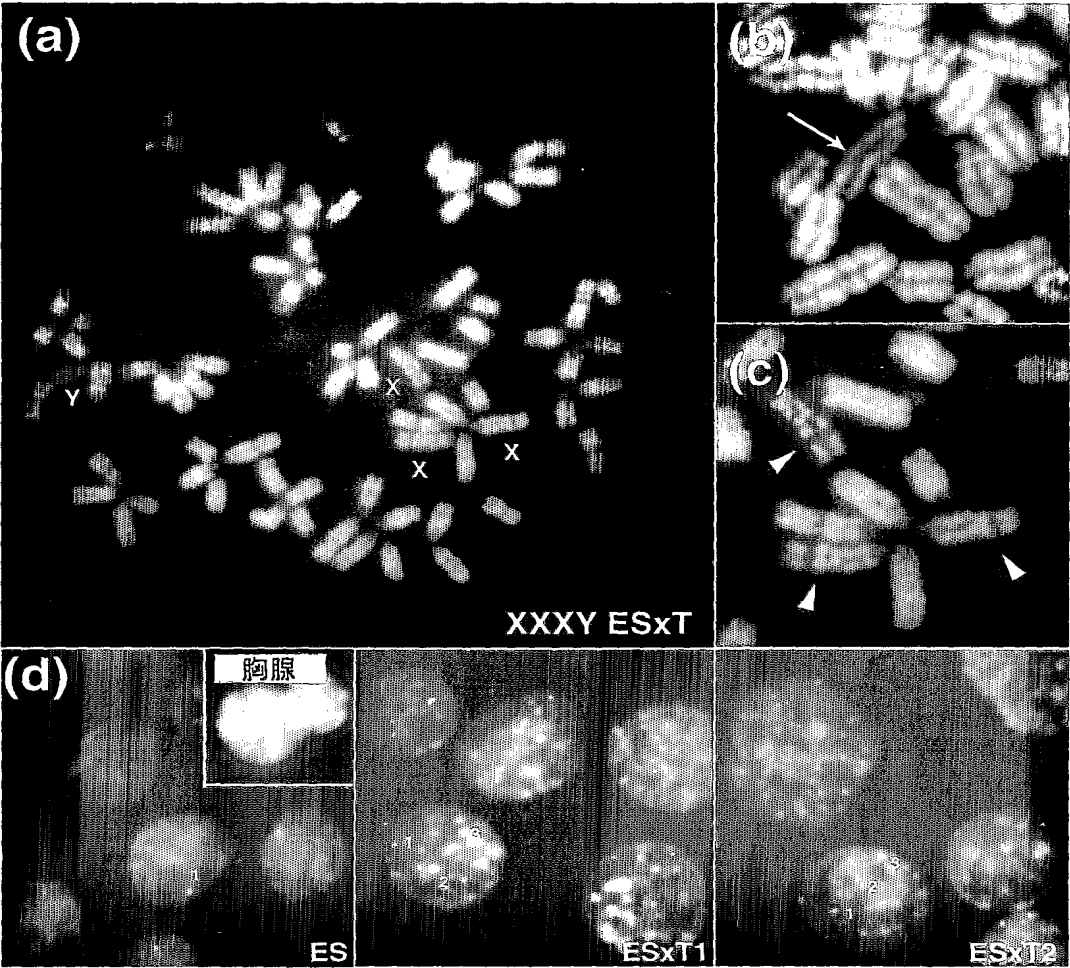


図 3

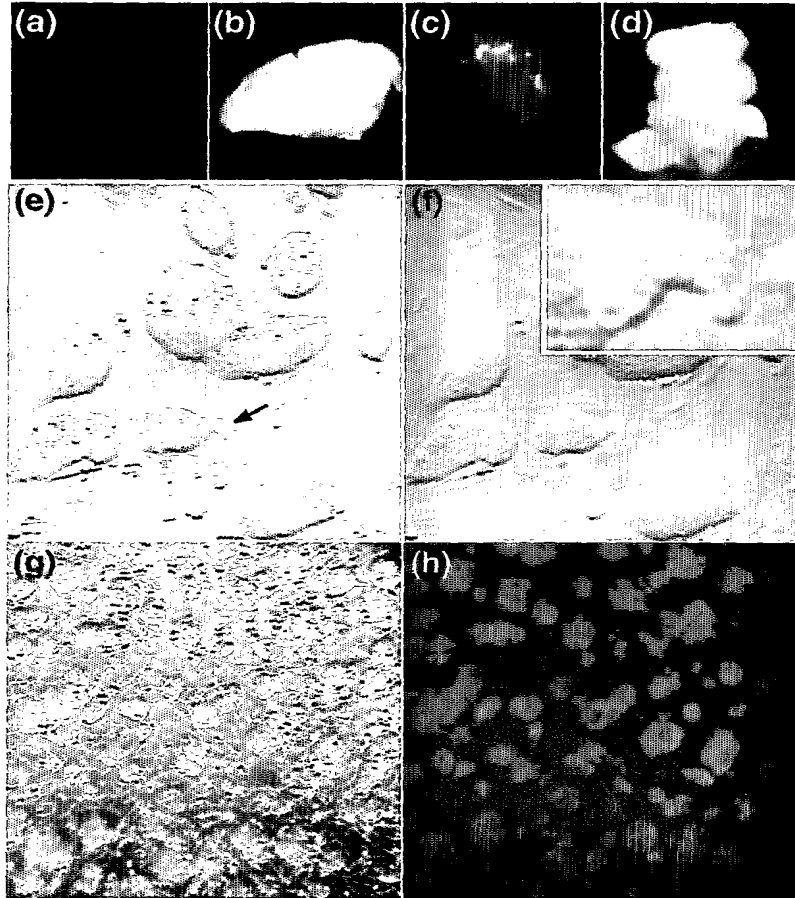


図 4

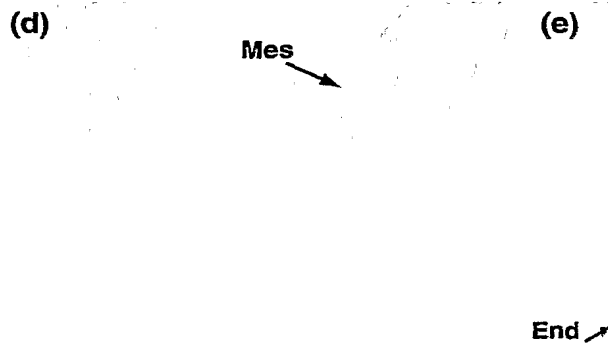
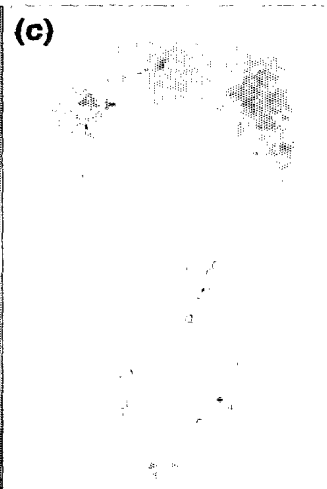
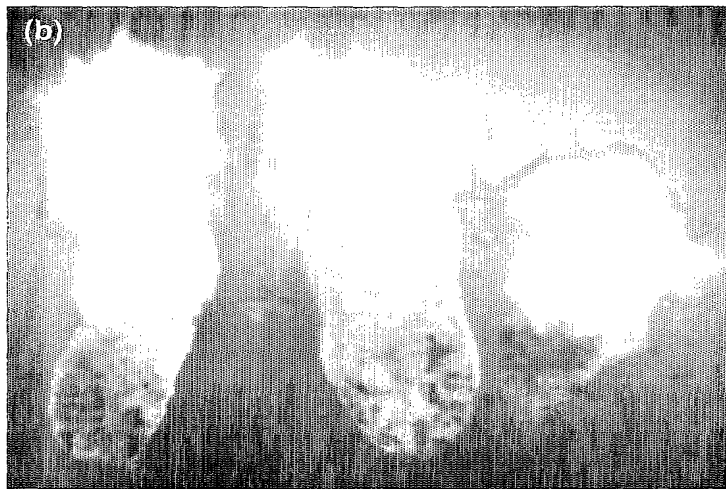
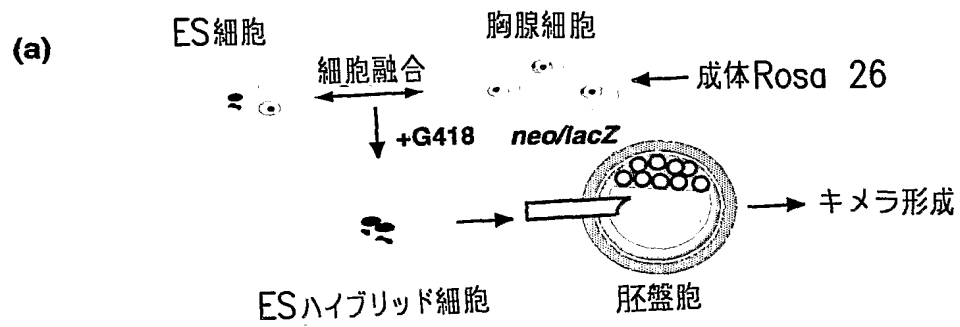
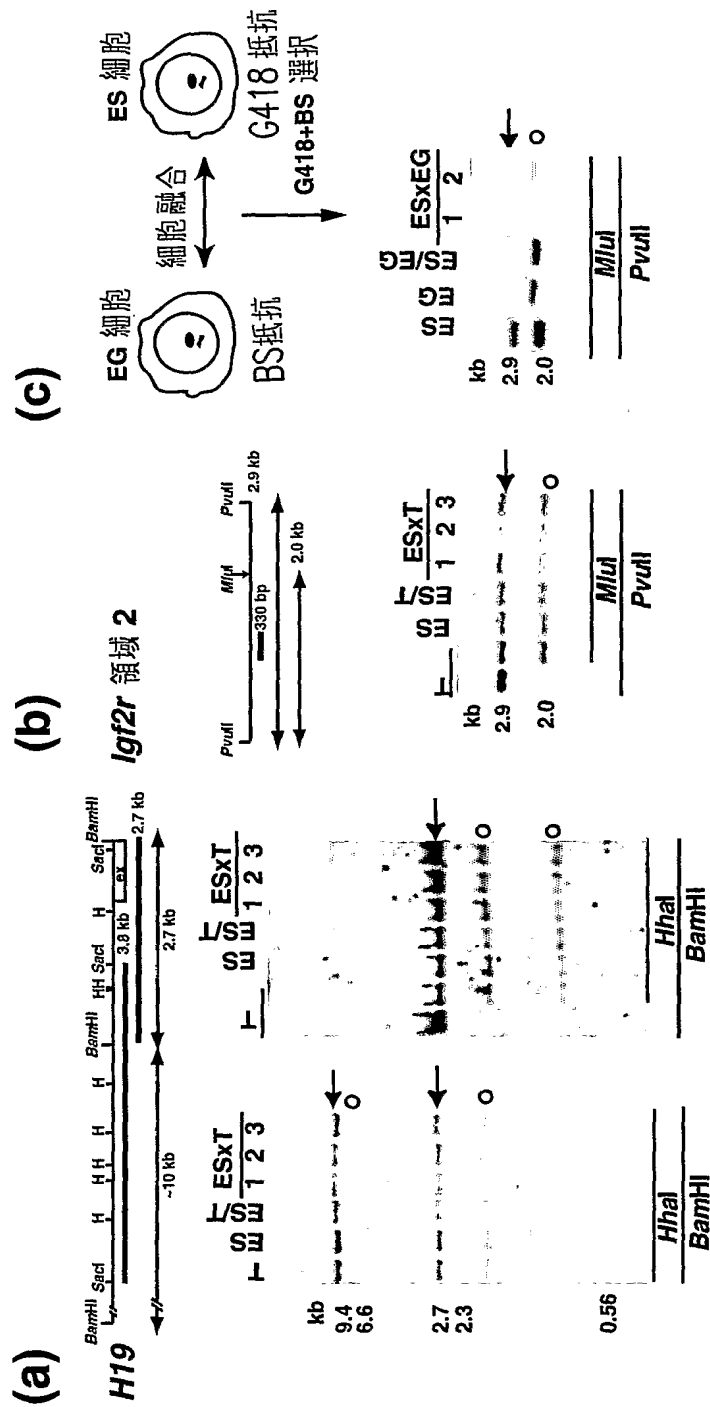
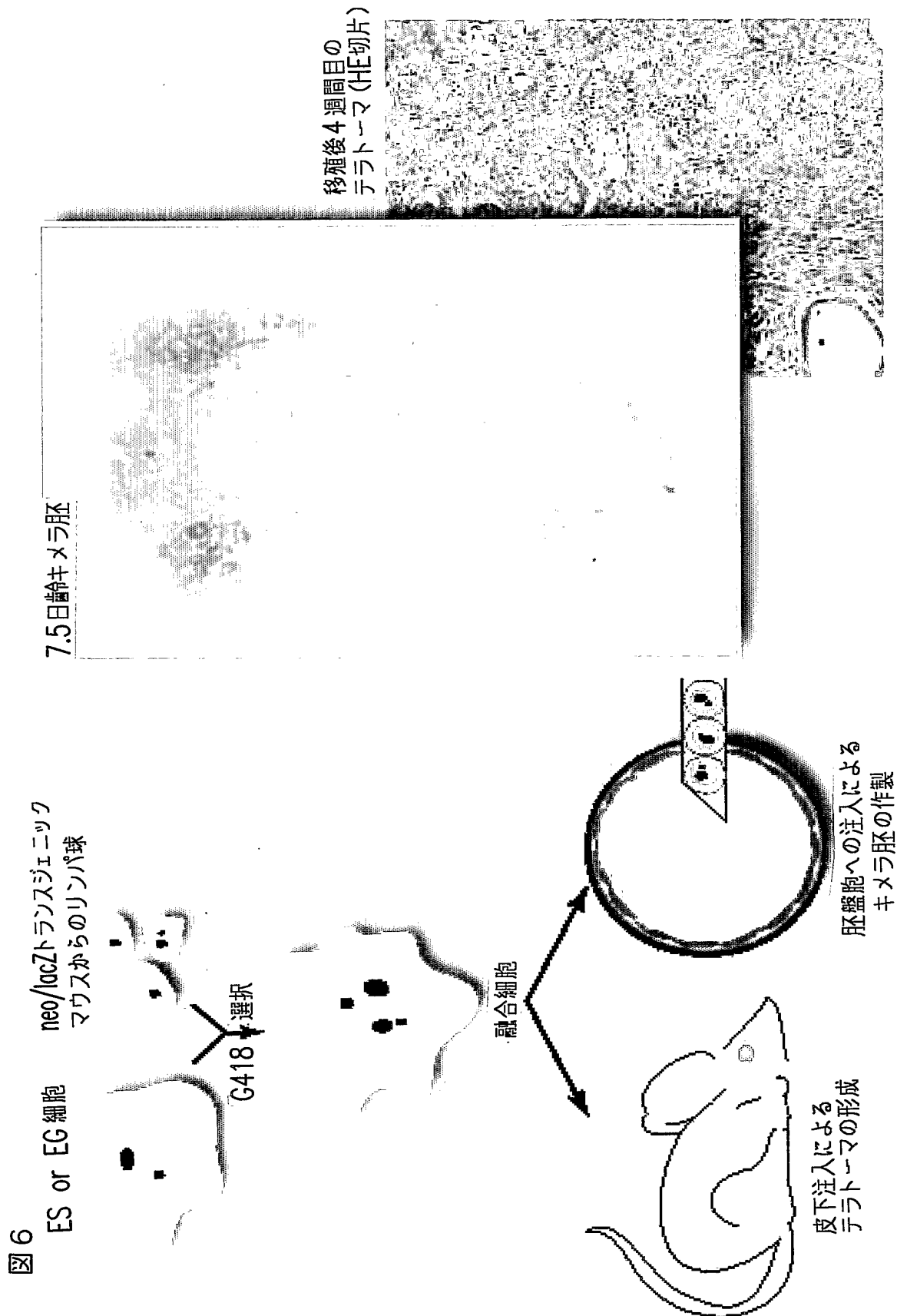
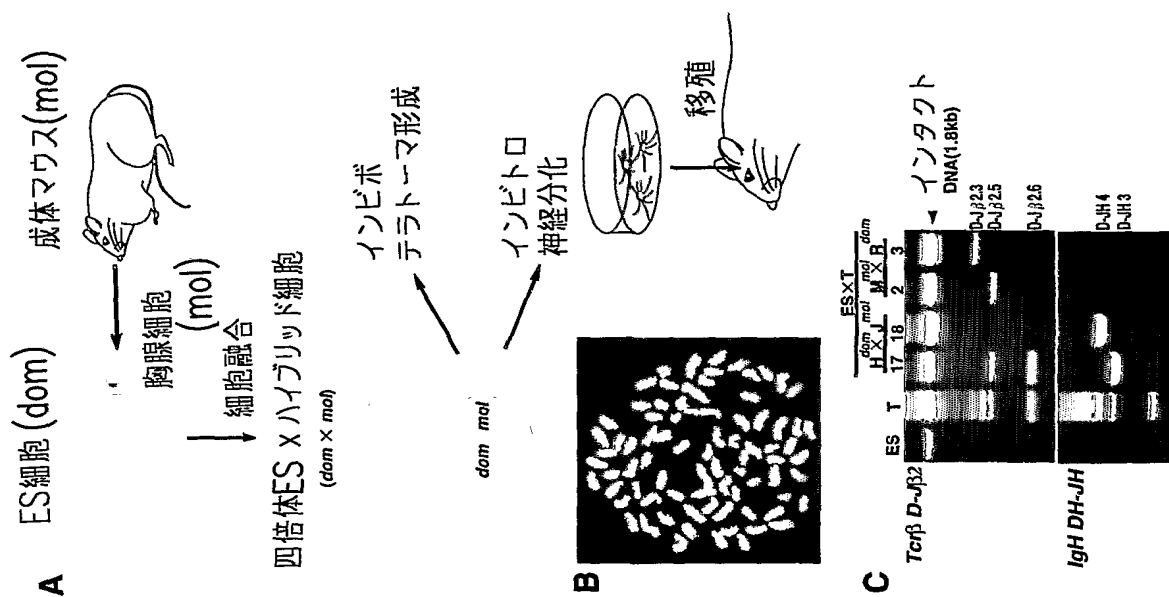


図 5





7  
天



8  
天

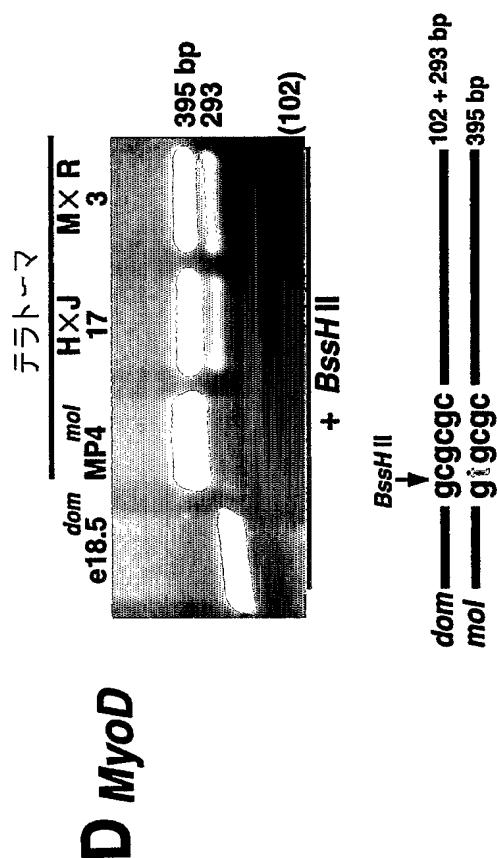
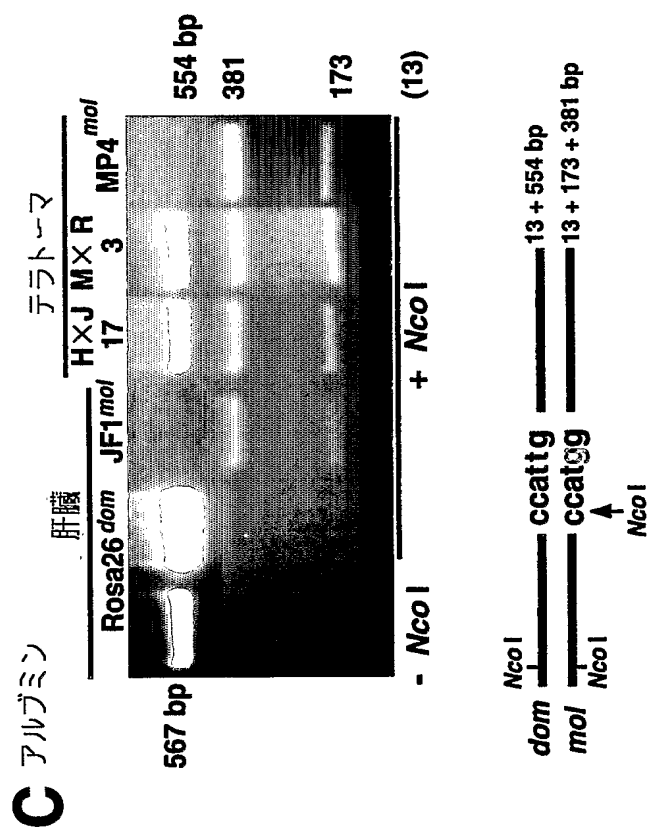
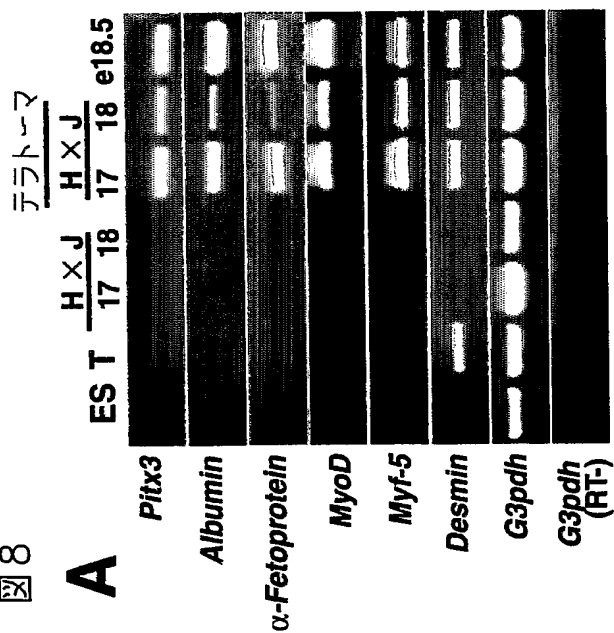
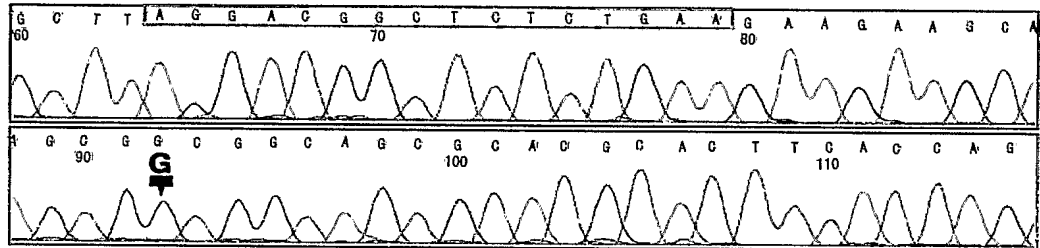
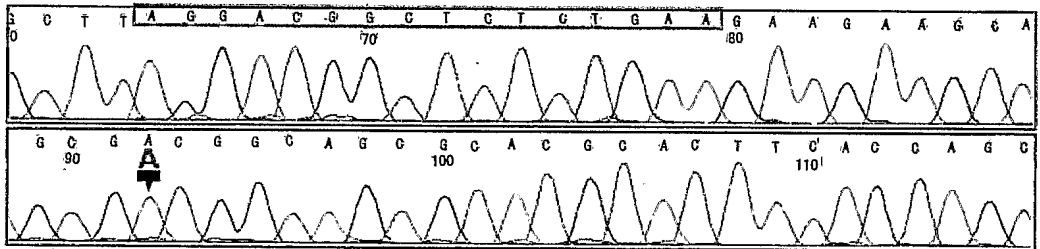




図 8

**B** *Pitx3*

センスプライマー

*dom**mol*ES(*dom*) × T(*mol*)

テラトーマ

H × J18

1 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGGCGG  
 2 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGACGG  
 3 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGACGG  
 4 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGACGG  
 5 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGACGG  
 6 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGGCGG  
 7 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGGCGG  
 8 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGACGG  
 9 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGACGG  
 10 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGACGG  
 11 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGGCGG  
 12 AGGACGGCTCTCTGAAGAAGAAGCAGCGGCGG

**G (*dom*) : A (*mol*) = 5 : 7**

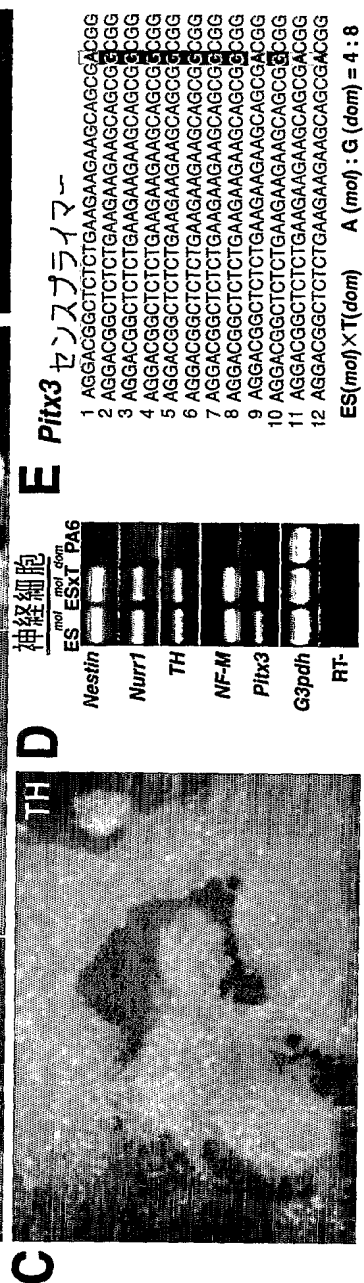
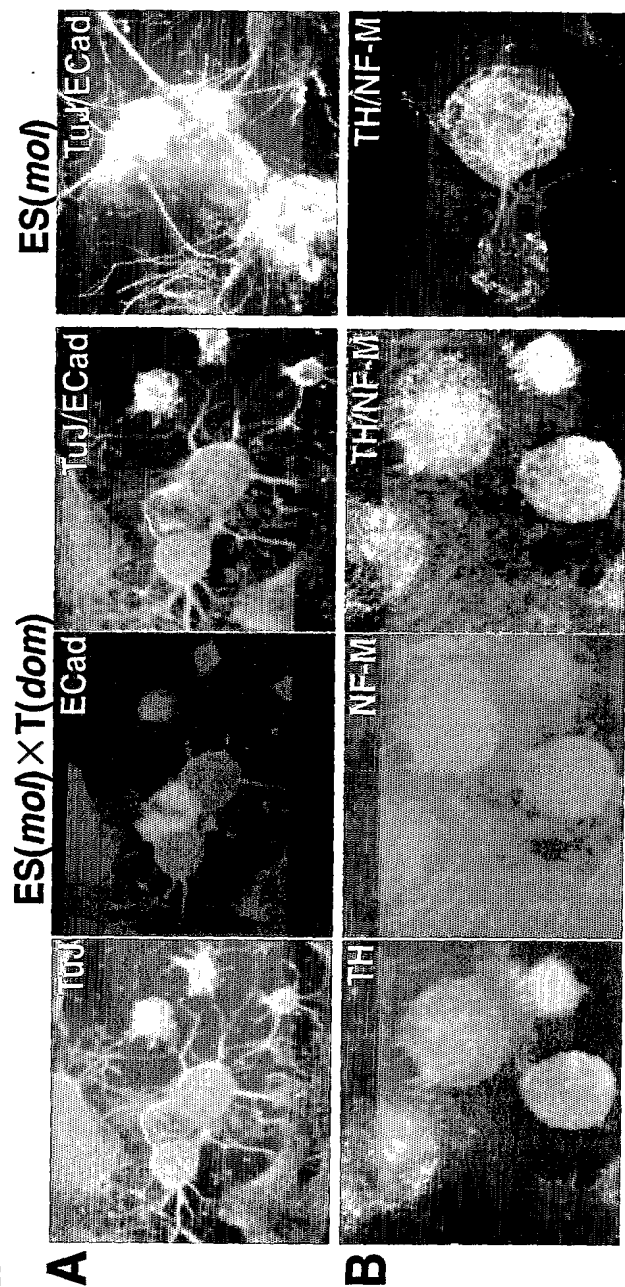


図 10

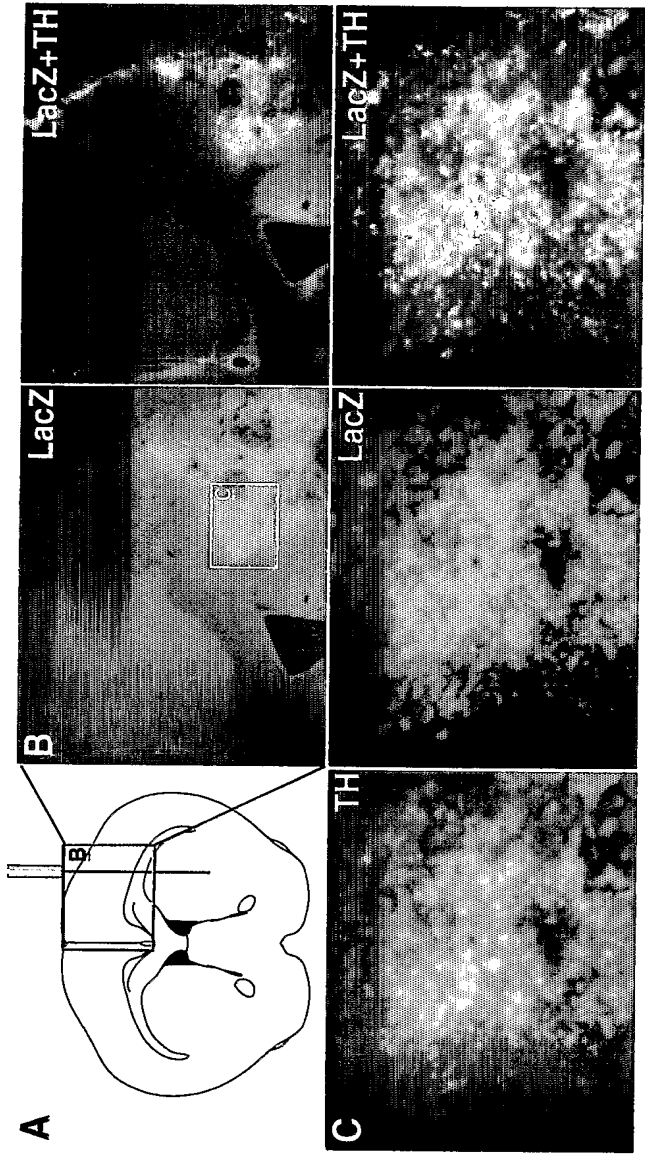


図 11

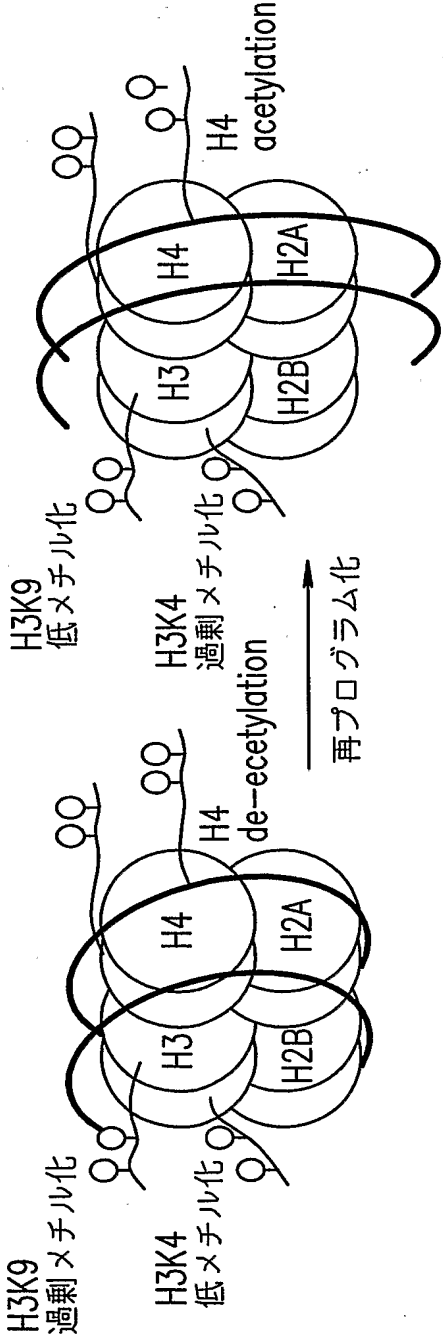


図 12

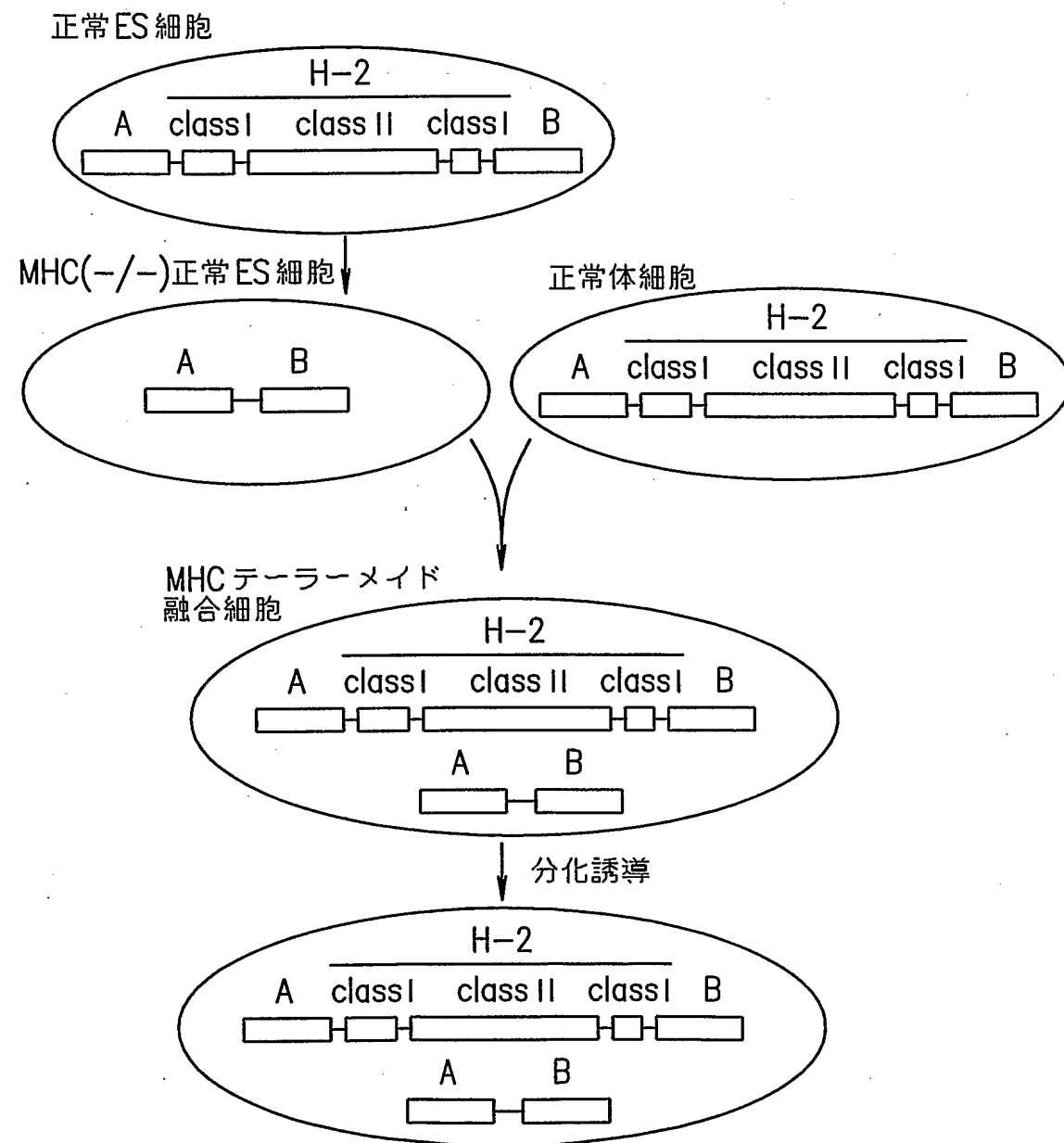
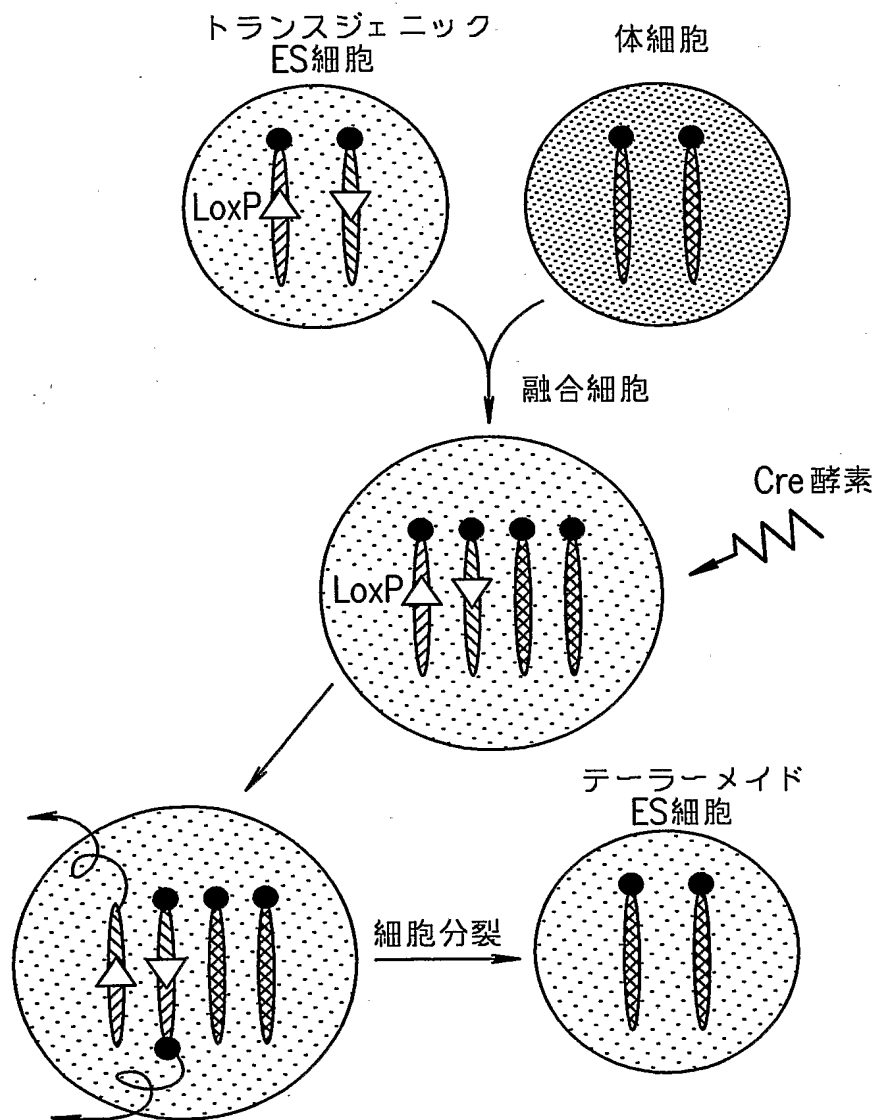
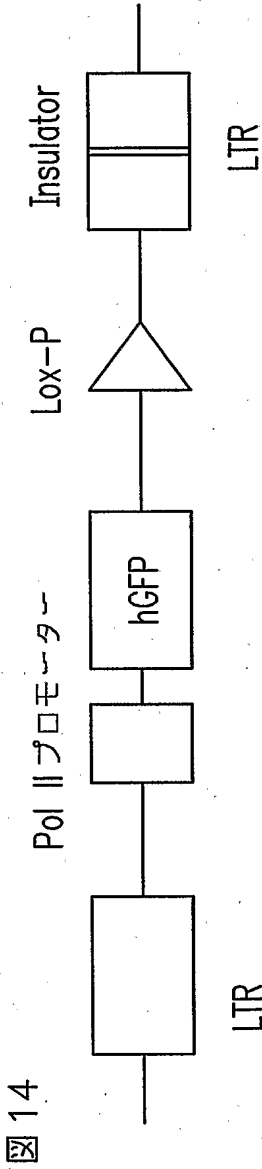


図 13





## 配列表

<110> Trans-Science, Inc.

5 <120> Tailor-made pluripotent stem cells and use thereof

<130> TR004PCT

<160> 52

10 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

20 <400> 1

ctaggtgagc cgtctttcca 20

25 <210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence



<220>

<223> primer

<400> 2

5   ttcaggggtca gcttgccgta

20

<210> 3

<211> 24

10   <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

15

<400> 3

gtaggcacct gtggggaaga aact

24

20   <210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

25   <220>

<223> primer

<400> 4

tgagagctgt ctctactat cgatt

25

<210> 5

<211> 27

5 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

10

<400> 5

acaagcttca aagcacaatg cctggct

27

15 <210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20 <220>

<223> primer

<400> 6

gggtctagac tctcagccgg ctccctcagg

30

25

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

5

<400> 7

ctcggatcct acttctagct ttct

24

10 <210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15 <220>

<223> primer

<400> 8

aaataccttg tgaaaacctg

20

20

<210> 9

<211> 20

25 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

cagatccttg cagttcatcc

20

5

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> primer

<400> 10

15 tccacagtca ctggggttcc

20

<210> 11

<211> 23

20 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

25

<400> 11

tttccctccc ggagattccc taa

23

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

5

<220>

<223> primer

<400> 12

10 cctgaggaga cggtagactga ggttccttg

29

<210> 13

<211> 25

15 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

20 <223> primer

<400> 13

aatcgatta aaaccctccg aacct

25

25

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

5 <400> 14

tagcacaagt ggaattgtgc tgcg

24

<210> 15

10 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

15 <223> primer

<400> 15

gtaggcacct gtggggaaga aact

24

20

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

25

<220>

<223> primer

<400> 16

tgagagctgt ctcctactat cgatt

25

<210> 17

5 <211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

10 <223> primer

<400> 17

acaagcttca aagcacaatg cctggct

27

15

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> primer

<400> 18

25 gggctctagac tctcagccgg ctccctcagg g

31

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

5 <223> primer

<400> 19

aaggagtgtc gccatggtga

20

10

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15

<220>

<223> primer

<400> 20

20 cctaggtttc ttgcagcctc

20

<210> 21

<211> 18

25 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer



<400> 21

tcgtattcca acaggagg

18

5

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> primer

<400> 22

15 cactcttcct tctggagatg

20

<210> 23

<211> 22

20 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

25

<400> 23

ttgggggtcgc tgcgggtctag cc

22

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

5

<220>

<223> primer

<400> 24

10 ggtcgtctat caggttgta cg

22

<210> 25

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

20

<400> 25

tgtagagga gcccagagtc

20

25 <210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 26

5 ccaagagcag cccatcaaag

20

<210> 27

<211> 20

10 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

15

<400> 27

ggagtgtcgc ttagaggtgc

20

20 <210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

25 <220>

<223> primer

<400> 28

tccagaaagc caagagaagc

20

5      <210> 29  
         <211> 23  
         <212> DNA  
         <213> Artificial sequence

         <220>  
         <223> primer

10

         <400> 29  
         tgaagagagc ggacaaggag atc 23

15      <210> 30  
         <211> 24  
         <212> DNA  
         <213> Artificial sequence

20      <220>  
         <223> primer

         <400> 30  
         tctggagtta agaaatcgga gctg 24

25

         <210> 31  
         <211> 24  
         <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

5

<400> 31

gccgagcaga ccaaggaggc catt

24

10 <210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15 <220>

<223> primer

<400> 32

ctggatggtg tcctggtagc tgct

24

20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

25 <213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 33

aggacggctc tctgaagaa

19

5 <210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10 <220>

<223> primer

<400> 34

ttgaccgagt tgaaggcgaa

20

15

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

20 <213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

25 <400> 35

tgaaggtcgg tgtgaacgga tttggc

26

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

5 <220>

<223> primer

<400> 36

catgtaggcc atgaggtcca c

21

10

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

15 <213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

20 <400> 37

gcccgcgctc caactgctct gat

23

<210> 38

25 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 38

cctacggtgg tgcgccctct gc

22

5

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

10 <213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

15 <400> 39

tgccatccgc tacattgaga g

21

<210> 40

20 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

25 <223> primer

<400> 40

ccgggtagca ggctgtgagt tg

22



<210> 41

<211> 297

<212> DNA

5 <213> Artificial sequence

<220>

<223> probe

10 <400> 41

gcaaagccag gttccttcct tcttccaaat atttcatat tttttttaa gatttattta 60

ttcattatat gtaagtacac tgtagctgtc ttacagacact ccagaagagg gcgtcagatc 120

15 ttgttacgta tggttgtgag ccacatgtg gttgctggga tttgaactcc tgaccttcgg 180

aagagcagtc ggggtgcctt atccactgag ccatctcacc agcccctggt ttattttttt 240

aattattatt tgctttttgt ttatcaagac agggtttctc tgcatagctc taattgt 297

20

<210> 42

<211> 391

<212> DNA

25 <213> Artificial sequence

<220>

<223> probe

&lt;400&gt; 42

gaattcgatt ggtggcctat ttgctcitat taaaagaaaa agggggagat gttgggagcc 60

gccccacat tcgccgttac aagatggcgc tgacatcctg tgttctatgt ggtaaacaaa 120

5

taatctgcgc atgtgccaag ggtatcttat gactacttgt gctctgccit ccccgtagcg 180

tcaactcggc cgaatgggctg cagccaatca gggagtgcga cgtccgaggc gaaggagaat 240

10 gctccttaag agggacgggg tttcgttctc tctctctctt gcttttctct ctctcttgct 300

tttctctctc tcttgcttct tgctctcttg ctctctgcac tctgttcctg aagatgtaag 360

aataaagctt tgcgaatca ctagtgaatt c 391

15

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

25 &lt;400&gt; 43

ctagacgggt gggttaagcaa 20

&lt;210&gt; 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

5 <220>

<223> primer

<400> 44

caggaggcct tcattttcaa

20

10

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

15 <213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

20 <400> 45

cgccctcagtt tctcccacc

19

<210> 46

25 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 46

agccttgacc tctggccc

18

5

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

15 <400> 47

ctccaaagcc aaaacctgtc

20

<210> 48

20 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

25 <223> primer

<400> 48

gctgactgga ggtgttccat

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

5 <213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

10 <400> 49

gggtgacaag aggtctggaa

20

<210> 50

15 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

20 <223> primer

<400> 50

cagcgtgtag ctcattcttg

20

25

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

5

<400> 51

caggggaagtt atgggggtct

20

10 <210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15 <220>

<223> primer

<400> 52

agaagaacgg gggagaagag

20

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/09732

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/02, 5/06, 9/10, C12Q1/02, A61L27/38, A61K45/00,  
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, 5/06, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/49137 A2 (Univ of Sheffield), 24 August, 2000 (24.08.00), & EP 1153123 A2 & AU 200025636 A	1,2,7-16,18, 19,24,36-46, 50-54
X	Masako TADA et al., "Haiseikan Saibo ga Motsu Genome Sai-Program-ka Kiko", Experimental Medicine, 2001 August, 19(12), pages 1511 to 1517	1,2,7-16,18, 19,24,39-46, 50-53
X	TADA M. et al., Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, Dev Growth Differ, July 2001, 43(suppl), page S122	1,2,7-16,18, 19,24,39-46, 50-53
X	Accession No.1998:268653 on BIOSIS, Matveeva NM et al., In vitro and in vivo study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes, Mol.Reprod.Dev., 1998, 50(2), pages 128 to 138	1,2,7-16,18, 19,24,39-46, 50-53

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
12 December, 2002 (12.12.02)

Date of mailing of the international search report  
14 January, 2003 (14.01.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09732

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Edited by Nikkei Biotech, "Nikkei Bio Saishin Yogo Jiten Dai 4 Ban", 1995, Nikkei Business Publications, Inc., page 85	54, 55
X	Supervised by Tomokazu IMAHORI et al., "Seikagaku Jiten (Dai 3 Ban)", 1998, Tokyo Kagaku Dojin, page 909	54
P, X	TADA M. et al., Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, Curr.Biol., Oct. 2001, 11(19), pages 1553 to 1558	1, 2, 7-16, 18, 19, 24, 39-46, 50-53
T	Takashi TADA et al., "ES Saibo o Mochiita Kyozeitsu Han'no no Kaihi", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2002 August, 47(6), pages 715 to 722	1-46, 50-55
A	WO 00/67568 A (Stem Cell Sociences Pty Ltd.), 16 November, 2000 (16.11.00), & EP 1198169 A1	1-46, 50-55
A	Clarke DL et al., Generalized potential of adult neural stem cells, Science, 2000, 288, pages 1660 to 1663	1-46, 50-55



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09732

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 47-49

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 47 to 49 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter not required to be searched by this International Searching Authority.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/02, 5/06, 9/10, C12Q1/02, A61L27/38, A61K45/00, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, 5/06 C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/49137 A2 (Univ of Sheffield), 2000.08.24 & EP 1153123 A2 & AU 200025636 A	1, 2, 7-16, 18, 19, 24, 36-46, 50-54
X	多田政子他、胚性肝細胞がもつゲノム再プログラム化機構 実験医学、2001年8月、19(12)、p.1511-1517	1, 2, 7-16, 18, 19, 24, 39-46, 50-53
X	Tada M et al., Nuclear reprogramming of somatic cells by in- vitro hybridization with ES cells, Dev Growth Differ, July 2001, 43(suppl), p. S122	1, 2, 7-16, 18, 19, 24, 39-46, 50-53

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.12.02

国際調査報告の発送日

14.01.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本美奈子



4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Accession No. 1998:268653 on BIOSIS Matveeva NM et al, In vitro and in vivo study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes, Mol Reprod dev, 1998, 50(2), p. 128-138	1, 2, 7-16, 18, 19, 24, 39-46, 50-53
X	日経バイオテック編「日経バイオ最新用語辞典第四版」, 1995, 日経BP社, p. 85	54, 55
X	今堀和友他監修「生化学辞典 (第3版)」, 1998, 東京化学同人, p. 909	54
PX	Tada M et al., Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, Curr Biol, Oct 2001, 11(19), p. 1553-1558	1, 2, 7-16, 18, 19, 24, 39-46, 50-53
T	多田高他、ES細胞を用いた拒絶反応の回避、蛋白質・核酸・酵素、 2002年8月、47(6)、p. 715-722	1-46, 50-55
A	WO 00/67568 (Stem Cell Sciences Pty Ltd), 2000.11.16, & EP 1198169 A1	1-46, 50-55
A	Clarke DL et al., Generalized potential of adult neural stem cells, Science, 2000, 288, p. 1660-1663	1-46, 50-55

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 47-49 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。